



Universidad Nacional de Misiones  
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

**DESARROLLO DE RECUBRIMIENTO ACTIVO BASADO  
EN ALMIDÓN/ACETATO DE ALMIDÓN PARA  
PRESERVAR LA CALIDAD DE ALIMENTOS  
REGIONALES.**

*Por Pamela Soledad Cuenca*

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales  
de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS**

República Argentina

**2019**

**Director**

Dr. Oscar Alfredo Albani

**Co-director**

Dra. Laura Ana Ramallo

**TRIBUNAL EXAMINADOR** (Resolución Consejo Directivo N° 610/19)

Dr. Anibal Marcelo SLAVUTSKY

INIQUI- CONICET-UNSa

Dr. Fernando Esteban FELISSIA

IMAM- FCEQyN- UNaM

Dra. Alicia Esther ARES

IMAM- FCEQyN- UNaM

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA** (Disposición N° 132/20)

Posadas, 09 de marzo de 2020

**Desarrollo de recubrimiento activo basado en almidón/acetato de almidón para preservar la calidad de alimentos regionales.**

**Bqca. Pamela Soledad CUENCA**

**Lugar de desarrollo del trabajo de tesis**

Laboratorio de Preservación y Envases - Instituto de Materiales de  
Misiones UNaM-CONICET

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N° 366/17)**

Dr. Anibal Marcelo SLAVUTSKY	INIQUI- CONICET- UNSa
Dra. María Cristina AREA	IMAM- CONICET-UNaM
Dra. Beatriz del Valle ARGUELLO	FCEQyN- UNaM

## **CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS**

Proyecto de Carrera N° 10933/11  
Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación  
Universitaria (CONEAU) N° 344/11.



*Al andar se hace camino  
Y al volver la vista atrás  
Se ve la senda que nunca  
Se ha de volver a pisar*

*Hace algún tiempo en ese lugar  
Donde hoy los bosques se visten de espinos  
Se oyó la voz de un poeta gritar  
«caminante no hay camino  
Se hace camino al andar»*

*Golpe a golpe, verso a verso...*

*(Antonio Machado)*

## AGRADECIMIENTOS

---

*A mis padres y hermanos. A Mateo que es el motorcito.*  
*A Oscar Albani, por ser un amigo y el mejor compañero de estudio.*  
*A Laura Ramallo por estar siempre presente y enseñarme un montón.*  
*A Jorge Maidana mi jefe, compañero de lucha.*  
*A Silvia Goyanes, que siempre apostó y apuesta por mi.*  
*A mi amiga Lucía Famá, por ayudarme siempre y apoyarme.*  
*A mis amigos del LPYMC: Pali, Santi y Oswald en especial.*  
*A Celedonio Alvarez, por aceptarme entre sus filas y fiarse de mi.*  
*Al MIOMET, por enseñarme, apoyarme y asistirme no solo técnicamente sino además*  
*en la vida. Salud Segovia!*  
*Lucy, Sergio, Alberto, Alvaro, Adriana, Bea, Carlos, David, Sara, cada uno de ustedes*  
*tiene un pedazo de mi corazón. Óuzo!*  
*A mis compañeros del Laboratorio de Preservacion y Envases: Nancy, Ariel, Valeria y*  
*Paula.*  
*A Adriana Yagas, por su apoyo en la microbiología.*  
*A mis amigas: Kathy, Elina, Clau, Gisela, Amelia, Mele, Sorayita, María Laura, Norah,*  
*Alicia.*  
*A mis amigos: Raúl Piris da Mota, Carlos Puglisi, Miguel López, Chiqui Brumovsky, El*  
*Gordo, Elías y Cristian.*  
*A la 16 de Abril.*  
*Al CONICET y a ERASMUS MUNDUS.*  
*A la Universidad de Valladolid, a la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad*  
*Nacional de Misiones.*  
*Al doctorado, por permitirme conocer el mundo.*

## RESUMEN:

---

El objetivo del trabajo de tesis fue el desarrollo de un bio-recubrimiento activo basado en almidón, acetato de almidón de mandioca y fracciones de almidón de mandioca que mejore la vida útil de productos regionales, particularmente de quesos.

Para ello la primera parte de la tesis aborda, el estudio de la estructura química, la estabilidad térmica y las propiedades morfológicas del almidón nativo de mandioca (AM) y de acetatos de almidón de alto grado de sustitución (AAM), sintetizados a partir de éste.

El almidón de mandioca se acetiló mediante un método simple y escalable para producir un material polimérico altamente hidrofóbico con uso potencial en el recubrimiento y el envasado de alimentos. La formación del éster se confirmó utilizando FTIR por la presencia de la señal de carbonilo alrededor de  $1749\text{ cm}^{-1}$ . Los grados de sustitución (DS) obtenidos por titulación estuvieron entre 1,9 y 2,9. El análisis termogravimétrico mostró un aumento en la estabilidad térmica con la acetilación, la muestra  $\text{DS} = 2.9$  se comportó como un homopolímero. Las micrografías SEM mostraron la pérdida de la estructura del gránulo de almidón y la aparición de nuevas estructuras en forma de colmena. AM y AAM se caracterizaron estructuralmente por RMN. El porcentaje de ramificación AM obtenido por  $^1\text{H}$  NMR fue 4,76. Usando  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR cuantitativo, se calculó el DS, confirmando los valores ya obtenidos por titulación de retorno y se determinó el patrón de sustitución regioselectivo, demostrando que la posición favorita de acetilación es la de C6.

Conocer las propiedades del almidón y de los acetilados permitió inferir sus propiedades en el estado coloidal y desarrollar películas de almidón de mandioca, en bajas concentraciones de soluto (menor al 1% p/v) utilizando solamente agua como plastificante, mediante gelatinización a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, se logró la separación de las fracciones de amilosa y amilopectina mediante el método de Mukerjea y Robyt (2009), y a partir de ellas se obtuvieron películas homogéneas y de buenas propiedades mecánicas, solubles en agua (amilopectina) e insolubles para los tiempos ensayados (amilosa).

Se prepararon películas de AAM utilizando un plastificante hidrófobo, a fines de obtener materiales altamente hidrófobos que puedan actuar como recubrimientos.

Se estudiaron estas películas mediante las técnicas convencionales de caracterización de polímeros de almidón haciendo foco en el estudio del efecto de almacenamiento, a fines de encontrar matrices adecuadas para ser utilizadas como recubrimientos.

Se encontró que, mediante la aplicación del tratamiento térmico a altas temperaturas en la gelatinización del almidón, se logró retrasar significativamente la retrogradación de películas de almidón, amilosa y amilopectina de mandioca, haciendo que las mismas mantengan buenas propiedades durante el almacenamiento. En tanto las películas de AAM sufrieron segregación y pérdida de su integridad a los pocos días de moldeadas.

En base a lo antes estudiado, se decidió ensayar películas de almidón y amilosa de mandioca como recubrimientos activos en quesos, utilizando como antimicrobiano natamicina.

La pérdida de peso, para distintas condiciones de humedad relativa en el almacenamiento y el desarrollo microbiano fueron estudiados, encontrándose que el recubrimiento de quesos con películas de almidón y de amilosa disminuyen la pérdida de peso y de color, siendo el recubrimiento de almidón de mandioca y 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina un método efectivo para controlar la población de hongos y levaduras, presentes tanto en el queso como en la película, así como retrasar el crecimiento de bacterias psicrótroficas. Esto último, permitiría aumentar la vida útil del alimento (queso barra) y ofrecer al consumidor un producto mejor conservado.

#### **PALABRAS CLAVE**

---

Almidón de Mandioca- Acetato de almidón de mandioca- Alto Grado de Sustitución- Recubrimiento activo- Preservación de quesos.

The objective of the thesis work was the development of an active bio-coating based on starch, cassava starch acetate and cassava starch fractions that improve the shelf life of regional products, particularly cheese.

For this, the first part of the thesis deals with the study of the chemical structure, thermal stability and morphological properties of native cassava starch (CS) and synthesized high-grade cassava starch acetates (CSA).

Cassava starch was acetylated by a simple and scalable method to produce a highly hydrophobic polymeric material with potential use in food coating and packaging. The formation of ester was confirmed using FTIR by the presence of the carbonyl signal around  $1749\text{ cm}^{-1}$ . The degrees of substitution (DS) obtained by titration were between 1.9 and 2.9. The thermogravimetric analysis showed an increase in thermal stability with acetylation, the sample DS = 2.9 behaved as a homopolymer. SEM micrographs showed the loss of starch granule structure and the appearance of new hive-shaped structures. CS and CSA were structurally characterized by NMR. The percentage of CS branching obtained by  $^1\text{H}$  NMR was 4.76. Using  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  -NMR quantitative, the DS was calculated, confirming the values already obtained by titration and the regioselective substitution pattern was determined, demonstrating that the favorite position of acetylation is that of C6.

Knowing the properties of starch and acetylates allowed to infer their properties in the colloidal state and to develop films of cassava starch, in low concentrations of solute (less than 1% w / v) using only water as plasticizer, by gelatinization at 120 C. On the other hand, the separation of the amylose and amylopectin fractions was achieved by the method of Mukerjea and Robyt (2009), and from these homogeneous films were obtained with good mechanical properties, soluble in water (amylopectin) and insoluble (amylose) for the studied times.

CSA films were prepared using a hydrophobic plasticizer, in order to obtain highly hydrophobic materials that could act as coatings.

These films were studied using conventional starch polymer characterization techniques focusing on the study of the storage effect, in order to find suitable matrices to be used as coatings.

It was found that by applying the heat treatment at high temperatures in the gelatinization of starch, the retrogradation of starch, amylose and amylopectin films of

cassava was significantly delayed, making them maintain good properties during storage. Meanwhile, CSA films suffered segregation and loss of integrity within a few days of being molded.

Based on the previously studied, it was decided to test starch films and cassava amylose as active coatings in cheeses, using natamycin as antimicrobial.

Weight loss, for different conditions of relative humidity in storage and microbial development were studied, finding that the coating of cheeses with starch and amylose films decrease the loss of weight and color, being the cassava starch coating and 10 mg / dm<sup>2</sup> of natamycin an effective method to control the population of fungi and yeasts, present in both cheese and film, as well as retard the growth of psychrotrophic bacteria. The latter would increase the shelf life of the food (cheese bar) and offer to the consumer a better-preserved product.

## **KEYWORDS**

---

Cassava Starch - Active Coating - Cassava Starch Acetate - High Degree of Substitution  
- Cheese Preservation



## TABLA DE CONTENIDOS

---

CAPÍTULO 1 .....	1
Estado del arte y marco teórico .....	1
ESTADO DEL ARTE.....	2
Almidón.....	4
Estructura química del almidón .....	4
Amilosa.....	4
Amilopectina.....	5
Estructura del granulo de almidón .....	6
Gelatinización .....	7
Retrogradación.....	7
Importancia del almidón.....	8
Importancia del almidón de mandioca .....	8
Sobre el Cluster de mandioca en Misiones.....	9
Capacidad formadora de películas .....	10
Modificación del almidón.....	10
Acetilación del almidón.....	11
Plastificantes .....	11
Plastificantes hidrofílicos: Glicerol.....	12
Plastificantes externos hidrófobos: (2-docecen-1-il) anhídrido succínico (DSA) .....	12
Matrices biopoliméricas usadas como recubrimientos activos.....	13
El agente activo.....	13
MARCO TEÓRICO.....	14
Principales técnicas de caracterización de materiales biopoliméricos.....	14
Propiedades de permeación .....	14
Métodos experimentales de medición de permeabilidad.....	16
Propiedades Mecánicas .....	16
Ensayo de tracción: esfuerzo y deformación .....	16
Análisis de un diagrama de deformación .....	17
Análisis de cristalinidad: difracción de rayos X .....	18
Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	19
Espectrofotometría infrarroja.....	20
Propiedades térmicas.....	20



Almidón y resonancia magnética nuclear .....	21
Experimentos de RMN.....	23
Técnicas monodimensionales de RMN.....	23
Espectro de $^1\text{H}$ .....	23
Espectro de Carbono desacoplado de protón $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ .....	25
Técnicas bidimensionales de RMN.....	27
Experimentos homonucleares.....	27
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (COrrrelation SpectroscopY) y $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY).....	27
NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy) y ROE (rotating-frame Overhauser enhancement) .....	28
Experimentos heteronucleares .....	29
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation):.....	29
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) .....	30
OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS.....	31
HIPÓTESIS.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2 .....	37
Preparación y caracterización de materiales: almidón de mandioca y acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución .....	37
INTRODUCCIÓN .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Materiales .....	41
Síntesis de acetato de almidón de mandioca .....	41
Método en medio ácido .....	41
Determinación del grado de sustitución mediante valoración química por retorno.....	42
$^1\text{H}$ -RMN de almidón nativo y acetato de almidón de mandioca .....	42
$^{13}\text{C}$ -RMN de almidón nativo y acetato de almidón de mandioca .....	42
Resonancia Magnética Nuclear bidimensional.....	43
Determinación del grado de ramificación de almidón nativo de Mandioca.....	44
Determinación del Porcentaje de amilosa por $^1\text{H}$ -RMN del almidón nativo .....	44
Determinación del grado de sustitución mediante $^1\text{H}$ -RMN de almidones acetilados .....	44
Determinación del grado de sustitución mediante $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN cuantitativo de almidones acetilados. Identificación del patrón de sustitución regioselectivo .....	45
Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	45
Análisis Termogravimétrico .....	46
Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	46

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
Síntesis de acetato de almidón de mandioca .....	46
<sup>1</sup> H-RMN de almidón nativo de mandioca .....	47
Resonancia Magnética Nuclear bidimensional.....	49
Determinación del grado de ramificación de almidon nativo de Mandioca.....	54
Determinación del Porcentaje de Amilosa por <sup>1</sup> H-RMN del almidón nativo .....	54
<sup>1</sup> H-RMN de acetato de almidón de mandioca .....	55
Determinación del grado de sustitución mediante <sup>1</sup> H-RMN de almidones acetilados .....	57
<sup>13</sup> C-RMN y <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}-RMN.....	58
Almidón de mandioca .....	58
Acetato de almidón de mandioca .....	59
Determinación del grado de sustitución mediante <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}-RMN cuantitativo de almidones acetilados .....	61
Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	62
Almidón de mandioca .....	62
Acetatos de almidón de mandioca.....	62
Propiedades térmicas de almidón nativo: análisis termogravimétrico.....	63
Almidón de mandioca .....	63
Acetato de almidón de mandioca.....	64
Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	65
Almidón de mandioca .....	65
Acetato de almidón de mandioca.....	66
CONCLUSIONES .....	70
ABREVIATURAS.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CAPÍTULO 3 .....	76
Desarrollo y caracterización de películas de almidón, amilosa, amilopectina de mandioca y acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución.....	76
INTRODUCCIÓN .....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
Materiales .....	79
Obtención de películas de almidón nativo de mandioca .....	79
Separación de amilosa de mandioca y obtención de películas .....	80
Separación de amilopectina de mandioca y obtención de películas .....	81
Películas de acetato de almidón de mandioca (AAM) de alto grado DS=2,9 .....	81
Caracterización de películas .....	82
Espesor .....	82

Humedad.....	82
Propiedades mecánicas cuasi-estáticas.....	83
Permeabilidad al vapor de agua .....	83
Solubilidad.....	84
Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	84
Difracción de Rayos X .....	84
Microscopía electrónica de Barrido (SEM).....	85
Propiedades Térmicas.....	85
Ensayos cualitativos de biodegradabilidad en tierra .....	86
Efecto del almacenamiento de las películas .....	86
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	86
Películas de almidón, amilosa y amilopectina.....	86
Humedad.....	90
Solubilidad.....	91
Propiedades de Permeación al Vapor de agua.....	92
Propiedades Mecánicas de las películas de almidón, amilosa y amilopectina ...	94
Difracción de Rayos X .....	95
Espectroscopía Infrarroja (ATR / FTIR) .....	101
Análisis termogravimétrico y termodiferencial de películas de almidón, amilosa y amilopectina (TGA – DTA).....	105
Morfología de los films de almidón, amilosa y amilopectina .....	109
Ensayos cualitativos de Biodegradabilidad de Películas.....	111
Películas de acetato de almidón de Mandioca (AAM) de alto grado de sustitución .....	113
Humedad.....	115
Permeación al vapor de agua .....	115
Solubilidad.....	117
Propiedades Mecánicas .....	117
Selección de matrices viables a ser utilizadas como recubrimientos de quesos semiduros.....	118
CONCLUSIONES .....	120
ABREVIATURAS:.....	121
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
CAPÍTULO 4 .....	126
Formulación de recubrimientos activos y su efecto sobre la conservación de quesos regionales .....	126
INTRODUCCIÓN .....	127
MATERIALES Y MÉTODOS.....	131

Materiales .....	131
Preparación de los recubrimientos .....	132
Cálculo de las concentraciones de Natamicina .....	132
Formas de aplicación de los recubrimientos.....	132
Inmersión .....	132
Envoltorio en película auto soportada .....	132
Diseño experimental.....	133
Humedad.....	133
Pérdida de peso .....	133
Efecto de la temperatura y humedad relativa de almacenamiento en el desarrollo de microorganismos: ensayo de evaluación macroscópica.....	134
Ensayos microbiológicos: recuento total de bacterias, hongos y levaduras.....	134
DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....	135
Ventajas e inconvenientes en las aplicaciones de los recubrimientos de almidón y amilosa.....	135
Efecto de la temperatura y humedad relativa de almacenamiento en el desarrollo de microorganismos.....	136
Humedad.....	142
Evaluación de pérdida de peso .....	142
Recuento microbiológico .....	150
CONCLUSIONES .....	153
ABREVIATURAS.....	154
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
CAPÍTULO 5 .....	157
Conclusiones generales -Información complementaria .....	157
CONCLUSIONES GENERALES.....	158
INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA .....	161
Sección experimental 1 .....	162
Procedimiento general para la preparación de acetato de almidón con DS = 2,9 .....	162
Sección experimental 2 .....	163
Procedimiento general para la preparación de amilosa y amilopectina de almidón de mandioca .....	163
Verificación de separación de amilosa y amilopectina mediante espectrofotometría UV .....	163
Reacción de triyoduro con muestras de almidón .....	163
2D-RMN de almidón de mandioca nativo y acetatos de almidón de mandioca (CSA30, CSA90 y CSA120) .....	166
RESUMEN DE TABLAS Y FIGURAS.....	174

Figuras:.....	174
Tablas: .....	178
TRABAJO CIENTÍFICO GENERADO A PARTIR DEL TRABAJO DE TESIS	
.....	180
Preparation and Characterization of Cassava Starch Acetate with High Substitution Degree. ....	181
Películas y materiales compuestos basados en almidón de mandioca acetilado de alto grado de sustitución.....	183
Trabajos en Congresos y Jornadas.....	184
Desarrollo y caracterización de películas de amilosa y amilopectina de mandioca.....	184
Synthesis and Characterization of Cassava Starch Acetates with High Degree of Substitution. ....	184
Amilosa y amilopectina de mandioca: desarrollo y caracterización de películas sin plastificantes agregados .....	185
Síntesis y caracterización de acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución. ....	185
Acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución como posible material polimérico para la liberación controlada de fármacos.....	185
PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LOS QUE SE DESARROLLÓ LA TESIS	
.....	186
BECAS OBTENIDAS EN EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL.....	187



# *CAPÍTULO 1*

## *Estado del arte y marco teórico*

---

## ESTADO DEL ARTE

---

Los materiales utilizados en envases y recubrimientos para alimentos han estado, en gran medida, basados en materiales no renovables: metales, productos derivados del petróleo. En los últimos años, la preocupación cada vez mayor por el cuidado del medio ambiente ha renovado interés en el desarrollo de materiales biodegradables. Se han hecho esfuerzos importantes para identificar materiales alternativos, basados en los polímeros obtenidos a partir de fuentes renovables, que son, además, reconocidos como biodegradables (Catalá & Gavara, 1996a)(Catalá & Gavara, 1996b).

Están disponibles comercialmente bioplásticos fabricados a partir de resinas obtenidas por síntesis química de monómeros de fuentes renovables que presentan excelentes propiedades, por ejemplo ácido poliláctico (PLA Cargill®) (Auras, Harte, & Selke, 2002) o Mater-bi (Novamont®), pero estos materiales son bastante costosos.

Los recubrimientos a base de almidón han llamado la atención debido a su disponibilidad, precio y buen rendimiento. Las principales investigaciones se han centrado en la plastificación del almidón nativo para ser procesado como un plástico normal, bajo la acción de temperatura y presión adecuadas. Los polímeros basados en quitosano y almidón (García, Martino, & Zaritzky, 2000; García, Pinotti, Martino, & Zaritzky, 2004; Mucha & Pawlak, 2005) han probado ser buenos formadores de películas. Varios plastificantes (glicerol, triacetina, formamida, etc) se han añadido al almidón para lograr una disminución de las interacciones moleculares de la cadena y mejorar sus propiedades mecánicas. Sin embargo, estos plásticos nativos a base de almidón todavía tienen elevada sensibilidad al contenido de humedad, lo que limita su aplicación (Liu, 2005).

El almidón se compone principalmente de cadenas ramificadas y lineales de moléculas de glucosa, denominados como amilopectina y amilosa, respectivamente.

La amilosa es esencialmente una molécula lineal con unas pocas ramas, mientras que la amilopectina es una molécula altamente ramificada. La preponderancia de amilosa en el almidón da películas más fuertes. La estructura ramificada de amilopectina conduce generalmente a películas con diferentes propiedades mecánicas a las de la amilosa, por ejemplo, la disminución de la energía de rotura (Tharanathan, 2003).

Mukerjea & Robyt, (2010) ensayaron un método para separar amilosa de amilopectina solubilizando primero los gránulos de almidón, mediante el calentamiento de una suspensión de los gránulos en agua a 121 °C.



Lourdin, Valle, & Colonna, (1995) ha estudiado las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua de películas de amilosa al 100% obtenidas a partir de almidón de guisantes y amilopectina de almidón seroso de maíz, "waxy maíz".

La acetilación es un método para aumentar la resistencia al agua de las películas de almidón, ya que los grupos hidroxilo (hidrófilos) son sustituidos por grupos acetilo (hidrofóbicos) que impiden la formación de puentes con las moléculas de agua, disminuyendo la higroscopicidad, la solubilidad, mejorando la plasticidad y procesabilidad del almidón acetilado, respecto al almidón nativo (Fringant, Rinaudo, Gontard, Guilbert, & Derradji, 1998; López, García, & Zaritzky, 2008). Existen trabajos de investigación orientados a mejorar las propiedades de las películas de acetato de almidón recurriendo al uso de aditivos especiales, que están siendo utilizados en el área de liberación controlada de drogas. Tarvainen et al., (2003) investigaron la capacidad de los anhídridos alquénil-succínicos (n-ASA) para mejorar las características de formación de películas de acetato de almidón de papa, grado de sustitución 2,8. Pelissari et al., (2012) estudiaron películas compuestas de almidón de mandioca y quitosano producidas por extrusión con soplado y empleando glicerol como plastificante, para el envasado de alimentos.

Por otro lado, han sido investigados recubrimientos activos, recubrimientos comestibles y películas con agregado de agentes activos, con mucha intensidad en los últimos años. Mei, Yuan, Wu, & Li, (2013) estudiaron películas de quitosano-almidón con agregado de glicerol y aceite de perilla como plastificantes, para recubrimiento de quesos, encontrando buen desempeño en cuanto al desarrollo microbiano.

Hauser & Wunderlich, (2011) estudiaron películas de acetato de polivinilo con un recubrimiento laqueado conteniendo ácido sórbico como agente antimicrobiano para envases de quesos y fiambre de cerdo, encontrando buenos resultados en cuanto al control en el crecimiento de algunos microorganismos específicos. Alrabadi, (2012) estudió el efecto de la extensión de la vida útil de queso cheddar, usando películas de polietileno de baja densidad (LPDE), conteniendo Nisina como agente antimicrobiano.

Lucera et al., (2014) estudiaron el efecto de nanopartículas de plata (Ag-Np) agregadas a un recubrimiento de alginato de sodio, para preservar la calidad de quesos, encontrando un significativo aumento de la vida útil.

## **Almidón**

Después de la celulosa, el almidón es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. El almidón es la fuente de carbohidratos más importante para la nutrición humana, además de tener un papel importante en los procesos de fabricación de alimentos, como la modificación de las propiedades de textura de los productos alimenticios. En todo el mundo, aproximadamente 60 millones de toneladas por año de almidón se extraen de diversos cultivos de cereales, tubérculos y raíces (Yang, Chaib, Gu, & Hemar, 2017).

El almidón existe en forma de gránulos que varían en tamaño, típicamente de 1 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, y forma (poligonal, esférica y lenticular), dependiendo de su origen (Copeland, Blazek, Salman, & Tang, 2009).

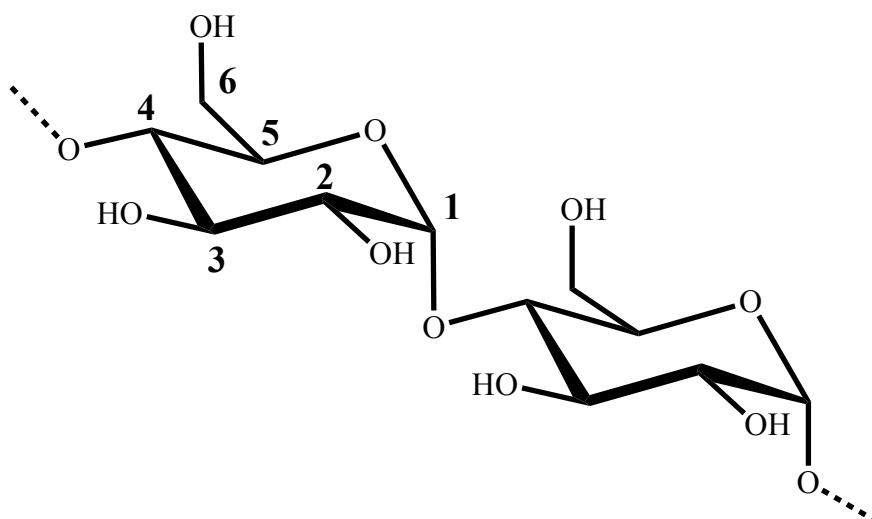
Los dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina, constituyen el 98% del 99% de los almidones nativos en base seca, junto con cantidades menores de lípidos, proteínas, minerales y fósforo en forma de ésteres de fosfato de glucosa. El contenido de amilosa y amilopectina varía típicamente de 20 a 26% para amilosa y 74-80% para amilopectina, a excepción de los almidones cerosos que pueden tener prácticamente 100% de amilopectina, mientras que los almidones de maíz modificados genéticamente con alto contenido de amilosa contienen hasta un 80% de amilosa (Rumpold & Knorr, 2005). Aunque los lípidos y los minerales son componentes menores en peso, pueden desempeñar un papel importante en la determinación de las propiedades del almidón (Copeland et al., 2009; Pérez & Bertoft, 2010). El contenido de humedad de los gránulos de almidón nativo está generalmente entre el 10 y el 20%, por ejemplo, 13-15% para el almidón de trigo y hasta el 20% en el almidón de papa.

## **Estructura química del almidón**

### **Amilosa**

La amilosa es predominantemente un  $\alpha$ -1,4-glucano lineal con un peso molecular de  $10^5$ - $10^6$  Da. correspondiente a un grado de polimerización (DP) de 1000-10.000 unidades de glucosa (Copeland et al., 2009). La amilosa tiene la capacidad de formar complejos, los llamados complejos de inclusión helicoidal, con yodo, alcoholes orgánicos y ácidos (Rumpold & Knorr, 2005).

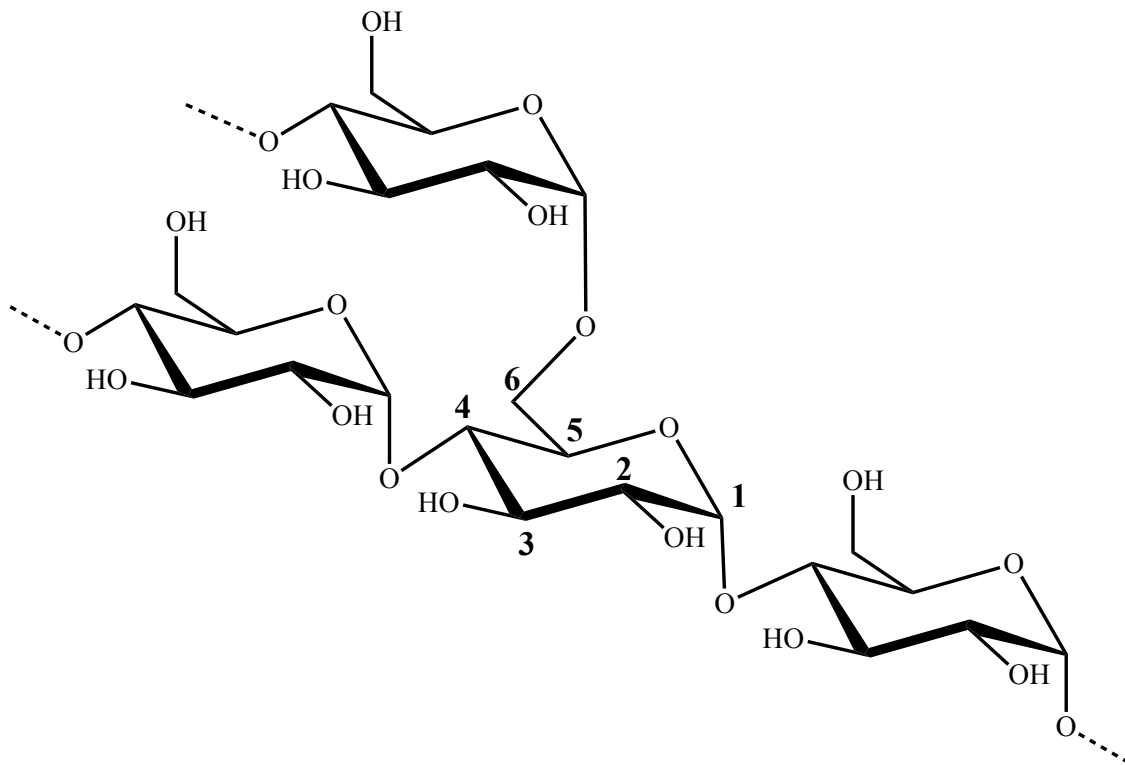
La Figura 1.1 muestra la estructura de la amilosa.



**Figura 1.1** Molécula de Amilosa

### **Amilopectina**

La amilopectina (Figura 1.2) tiene un peso molecular de aproximadamente  $10^8$  Da y un DP mayor a un millón, lo que representa una de las biomacromoléculas más grandes que se encuentran en la naturaleza. Además de los enlaces  $\alpha$ - 1, 4 que dominan la estructura de la amilosa, la amilopectina es un polímero altamente ramificado y posee un 4-5% de monómeros de glucosa con enlaces  $\alpha$ - 1, 6. Las ramificaciones son cadenas lineales de unas 24 a 26 glucosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos  $\alpha$ - 1, 4. Puede dividirse en secciones densas y cristalinas (agrupaciones) y secciones menos densas y amorfas sin cadenas laterales. Solo hay una cadena (C) que posee el único extremo reductor por molécula de amilopectina (Cameron & Donald, 1992).



**Figura 1.2** Molécula de Amilopectina

### Estructura del gránulo de almidón

En los gránulos de almidón que no están rodeados por ninguna envoltura, las moléculas de amilosa y de amilopectina se disponen en forma radial, formando una serie de capas concéntricas. En estas capas existen zonas amorfas y cristalinas. Las regiones cristalinas, en donde las cadenas están asociadas en forma de hélices, son formadas por las cadenas cortas de amilopectina organizadas en clusters, mientras que las áreas de puntos de ramificación son de carácter amorfo. Las moléculas de amilosa y amilopectina están distribuidas a través del gránulo y el nivel de enlaces puentes de hidrógeno entre estas moléculas y en la amilopectina misma, es responsable de la heterogeneidad del gránulo (Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2005). El hecho de que los gránulos de almidón son anisotrópicos debido a la presencia de regiones cristalinas en una masa predominantemente amorfa, da como resultado el fenómeno de doble refringencia o birrefringencia lo que a la luz polarizada se evidencia como una cruz de malta (Friedman, Hauber, & Katz, 1993).

## **Gelatinización**

La gelatinización del almidón, se puede lograr por calentamiento de una suspensión acuosa de los granulos o por efecto combinado de presión y temperatura con mínimos contenidos de humedad dando lugar al almidon termoplástico (TPS). Esta capacidad de gelificar, es una de las propiedades más importantes para el uso del almidón en la industria y en los alimentos en general. Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, pero se hinchan cuando se calientan en un medio acuoso. Inicialmente el hinchamiento es reversible y las propiedades ópticas del gránulo no se pierden; sin embargo cuando se alcanza una cierta temperatura, el hinchamiento llega a ser irreversible afectando la estructura del gránulo y causando la pérdida de la birresfringencia (Yang et al., 2017). Este proceso es conocido como gelatinización y ocurre en un intervalo de temperatura que sera función de la fuente botánica, ya que los gránulos presentan diferente resistencia debido a su composición y grado de cristalinidad. La gelatinización es un proceso endotérmico que va acompañada de la lixiviación de la amilosa y del aumento de la viscosidad de la suspensión de almidón. La solubilidad de los gránulos de almidón y la absorción continua de agua de los restos insolubles de los gránulos de almidón son responsables del aumento de la viscosidad (Hoseney, Zeleznak, & Yost, 1986). Aunque no hay consenso sobre el mecanismo de gelatinización, la gelatinización del almidón se considera comúnmente como una interacción compleja entre las transiciones vítreas de las regiones amorfas hidratadas y la fusión de las regiones cristalinas a través de la hidratación y disociación de hélices dobles. Al final de este fenómeno se genera una pasta en la que existen cadenas de amilosa de bajo peso molecular altamente hidratadas que rodean a los restos de los gránulos, también hidratados.

## **Retrogradación**

El desarrollo de la estructura y cristalinidad de los geles de almidón a corto tiempo está dominado por la gelación y cristalización de la amilosa. Los aumentos en el módulo de young de los geles durante el almacenamiento están ligados a la cristalización de la amilopectina, aumentando la rigidez de los gránulos y reforzando la matriz de amilosa (Miles, Morris, & Ring, 1985). La formación de cristales va acompañada por un aumento gradual en la rigidez y la separación de las fases entre el polímero y solvente (sinéresis). Estos procesos se agrupan bajo el término de retrogradación y afectan la

textura, digestibilidad y aceptación por el consumidor de los productos a base de almidón.

A nivel molecular se caracteriza por una asociación paralela mediante puentes de hidrógeno de las cadenas de amilosa lixiviadas (a tiempos cortos), produciendo una red tridimensional donde quedan los gránulos hinchados, y dentro de éstos la amilopectina recrystaliza (a tiempos largos), en un arreglo que dependerá del tipo de almidón y la temperatura de almacenamiento. Protzman, T. Wagoner, (1964) encontraron que la temperatura de gelatinización, la relación entre amilosa y amilopectina, el peso molecular, la fuente botánica (cereal versus tubérculo), la estructura fina de la amilopectina (longitud de la cadena y distribución), el contenido de humedad, la concentración de almidón y el secado influyen sobre la aparición de la retrogradación en el almidón y sus películas.

### **Importancia del almidón**

Se calcula que anualmente se extraen unos 60 millones de toneladas del almidón de una gran variedad de cultivos como: cereales, raíces y tubérculos, para uso en una asombrosa cantidad de productos como: papel, productos farmacéuticos, adhesivos para estampillas y madera laminada, para el acabado de textiles y como materia prima para elaborar etanol. En América latina y el Caribe está creciendo la producción comercial de almidón, con una fuerte tendencia a la producción de almidones modificados e hidrolizados (FAO: Mercado de almidón).

### **Importancia del almidón de mandioca**

La mandioca es una planta originaria de América tropical. Se cultiva en distintas regiones de América, Asia y África, donde es uno de los principales alimentos de más de 300 millones de personas. Se consumen principalmente sus raíces, por su alto contenido en hidratos de carbono, aunque en algunas partes del mundo como África y Brasil, también las hojas son utilizadas para alimentación humana como verdura fresca o deshidratada, además de ser un recurso importante en la alimentación del ganado (INTA, 2008).

En Argentina, se cultiva en toda la provincia de Misiones, y en algunos departamentos de las provincias de Corrientes, Chaco y Formosa.

En la provincia de Misiones, la mandioca constituye un cultivo de gran valor comercial. Sus raíces, ricas en almidón, aportan un importante y muy apreciado complemento de la

mesa familiar de la población rural y de buena parte de la población urbana (por ser una de las principales fuentes de hidrato de carbono) y junto con sus hojas y ramas, provee un forraje económico y muy valioso para el ganado. Además, es utilizada como materia prima de la industria para la extracción del “almidón” y sus derivados, por lo que representa una regular fuente de ingreso en la explotación agraria (INTA, 2008)

El alto contenido de almidón en la mandioca, hace de este un importante cultivo industrial además de ser un cultivo alimenticio rico en calorías. El almidón de mandioca es la segunda fuente de almidón en el mundo después del maíz, pero por delante de la papa y el trigo; se usa principalmente sin modificar, es decir como almidón nativo, pero también es usado modificado con diferentes tratamientos para mejorar sus propiedades de consistencia, viscosidad, estabilidad a cambios de pH y temperatura, gelificación y dispersión y de esta manera puede utilizarse en diferentes aplicaciones industriales que requieren ciertas propiedades particulares. (FAO, 2007).

### **Sobre el Cluster de mandioca en Misiones**

La Mandioca Misionera es utilizada en la elaboración de productos alimenticios, farmacéuticos y textiles demandados a nivel mundial. La provincia de Misiones es la principal productora de mandioca del país, con el 70% de la producción a nivel nacional. Alrededor del 25% de la producción anual se destina a la industria para obtener fécula, cuya demanda proviene de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Mendoza y Capital Federal con destino en la industria alimenticia, química, farmacéutica, de adhesivos y textiles.

Las principales líneas estratégicas sobre las que se concentra el Cluster son: desarrollar la producción de la materia prima con asesoramiento técnico, implementar tecnología en campo, analizar en laboratorio las mejoras genéticas, acercar al productor a las cooperativas e industrias para que exista el *feed back* comercial necesario en toda producción y abrir nuevos mercados para los industriales y cooperativas (Secretaría de Agroindustria- Presidencia de la Nación, 2019).



**Figura 1.3** Planta industrial almidón de mandioca

### **Capacidad formadora de películas**

La obtención y caracterización de películas a base de almidones nativos de diversas fuentes botánicas ha sido ampliamente estudiada por diversos autores (Alves, Mali, Beléia, & Grossmann, 2007; Flores, Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2007; García et al., 2000; López et al., 2008; López, Zaritzky, & García, 2010; Shogren, Swanson, & Thompson, 1992). Sin embargo, la naturaleza hidrofílica del almidón es la principal desventaja que limita el desarrollo de estos materiales; ya que muchas de sus propiedades dependen de la humedad ambiente (Shogren et al., 1992). Así, una alternativa para reducir estos inconvenientes es el uso de almidones modificados (López et al., 2010).

### **Modificación del almidón**

Las modificaciones de los almidones pueden realizarse por tres métodos: reacciones de cambios de tipo físico, químicos y microbianos o por combinaciones entre estas (Ortega-Toro, Contreras, Talens, & Chiralt., 2015).

La modificación física se realiza utilizando calor y humedad (pre-gelatinización); mientras que los tratamientos químicos implican la introducción de grupos funcionales en la molécula de almidón utilizando reacciones de derivatización (eterificación, esterificación, reticulación e injerto).

La modificación del almidón nativo mejora una o más propiedades fisicoquímicas específicas, como la resistencia a la retrogradación, el aumento en el hinchamiento, el mejoramiento de la fluidez, la compactación, entre otras.



Una innovación en el uso de almidones nativos y modificados, es su empleo en el desarrollo de envases ecológicos.

La modificación química del almidón podría ser una herramienta útil para personalizar el rendimiento general de las películas y recubrimientos de almidón especialmente en la producción de materiales sensibles al agua (Fringant, Rinaudo, Gontard, et al., 1998; López et al., 2008).

### **Acetilación del almidón**

Una de las posibles modificaciones químicas es la acetilación, que es una forma simple de mejorar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón.

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) solo permite en alimentos almidones con bajo grado de sustitución, para su aplicación como texturizantes, estabilizantes y espesantes de alimentos. El almidón acetilado que típicamente se utiliza en alimentos contiene 0,5-2,5% de grupos acetilos.

Almidones con un alto grado de sustitución (2,0-3,0) muestran un gran número de aplicaciones como aglutinantes para tabletas, adhesivos termoplásticos, filtros de cigarrillos, materiales de revestimiento, pero no para alimentos. En la industria farmacéutica los acetatos de almidón altamente sustituidos se han introducido recientemente como excipientes para las tabletas de compresión directa (Korhonen, Kanerva, Vidgren, Urtti, & Ketolainen, 2004).

### **Plastificantes**

El agregado de plastificantes a la resina polimérica normalmente produce una estructura de films más flexibles (menos frágil y quebradizo). Normalmente los plastificantes incrementan el volumen libre entre las cadenas de polímeros por reducción del número de centros activos disponibles para los contactos rígidos polímero-polímero. (Tarvainen et al., 2004).

Básicamente existen dos mecanismos diferentes de obtener la plastificación del almidón. Por un lado, se puede sintetizar mezclas de ésteres en los cuales el éster de un ácido graso (caproato o laurato) actúa como plastificante interno. Por otro lado, sustancias como el glicerol pueden ser usados como plastificantes externos, que son bien conocidos como plastificantes de acetato de celulosa (Fringant, Rinaudo, Foray, & Bardet, 1998).

Los plastificantes como el glicerol, el sorbitol, diversas ceras o aceites vegetales, son compuestos que se incorporan a las películas con la finalidad de reducir su carácter quebradizo, su dureza e incrementar la flexibilidad y resistencia al corte, ya que reducen efectivamente las fuerzas entre cadenas del polímero.

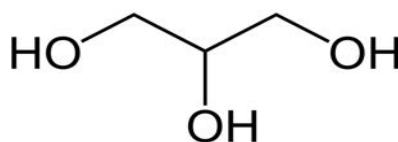
Los plastificantes más utilizados en materiales de la industria alimenticia incluyen:

- Mono, di, y oligosacáridos: glucosa, jarabes y miel principalmente.
- Polioles: sorbitol, glicerol, polietilenglicoles, etc.
- Lípidos y derivados, como ácidos grasos, monoglicéridos, surfactantes, y derivados de éster.

La principal característica que debe ofrecer un plastificante es la miscibilidad con el polímero considerado a fines de garantizar la compatibilidad, las fuerzas intermoleculares que actúan entre ambos, deben ser similares

#### **Plastificantes hidrofílicos: Glicerol**

Este polialcohol es comúnmente usado como plastificante para aumentar la flexibilidad, la maleabilidad y la adherencia de películas de polisacáridos como los almidones. El glicerol es un plastificante de tipo externo.

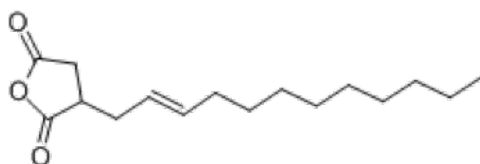


**Figura 1.4** Molécula de glicerol

#### **Plastificantes externos hidrófobos: (2-docecen-1-il) anhídrido succínico (DSA)**

La utilización de anhídridos succínicos (n-ASAs) para mejorar las propiedades mecánicas de los esteres de almidón fue estudiada por (Tarvainen et al., 2004).

El (2-docecen-1-il) anhídrido succínico, es un plastificante del tipo externo, con un peso molecular de 266,4 g/mol, punto de fusión de 182 °C y es prácticamente insoluble en agua.



**Figura 1.5** Molécula de DSA

### **Matrices biopoliméricas usadas como recubrimientos activos**

Recientemente, la industria alimentaria y la comunidad científica mostraron un interés creciente en las películas comestibles activas basados en antimicrobianos naturales, con el objetivo de mejorar la seguridad alimentaria. Existen varias ventajas al considerar esta estrategia para aplicaciones antimicrobianas: la incorporación de antimicrobianos atrapados en una matriz biopolimérica ayuda a disminuir la tasa de difusión desde la superficie hasta la mayor parte del producto alimenticio, lo que ayuda a mantener altas concentraciones del ingrediente activo en la superficie, tendencia positiva si la superficie es el lugar donde se requiere. Su soporte en una matriz también puede disminuir la interacción con otros aditivos alimentarios y componentes de los alimentos y con el oxígeno y la humedad del medio ambiente. Según diferentes investigadores, las matrices comestibles con actividad antimicrobiana constituyen una forma prometedora de administración antimicrobiana en el marco de la conservación de alimentos (Fajardo et al., 2010; Ollé Resa, Jagus, & Gerschenson, 2014; Ture, Eroglu, Ozen, & Soyer, 2011).

Dado que la contaminación de los alimentos es producida por poblaciones mixtas, es necesario usar antimicrobianos eficaces para las bacterias y también para los mohos y las levaduras. Varios autores desarrollaron matrices biopoliméricas que contenían nisina o natamicina (Fajardo et al., 2010; Ollé Resa, Gerschenson, & Jagus, 2016; Ture et al., 2011). Sin embargo, existen datos escasos (Ollé Resa et al., 2016, 2014) en relación con la actividad de estos antimicrobianos naturales incorporados en matrices de almidón de mandioca y utilizados en alimentos reales contra un cultivo mixto.

### **El agente activo**

Entre los antimicrobianos naturales, la nisina es el primer péptido antimicrobiano que recibe el estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) para aplicaciones alimentarias y su uso en diversos alimentos, por parte del Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Organización Conjunta de Alimentación y Agricultura /

Organización Mundial de la Salud (FAO / OMS). Exhibe actividad antimicrobiana hacia una amplia gama de bacterias Gram positivas, incluyendo *L. monocytogenes* (Cerqueira et al., 2010). La nisina es producida por cepas de *Lactococcus Lactis* y se usa ampliamente como conservante en alimentos, incluidos los productos lácteos.

La natamicina es un polieno antimicótico natural producido por *Streptomyces Natalensis* y se emplea actualmente en productos alimenticios a base de productos lácteos para prevenir la contaminación de levaduras y mohos. La natamicina ha sido considerada como un producto GRAS por la FDA (Koontz, Marcy, Barbeau, & Duncan, 2003) y también está indicada como conservante natural por la Unión Europea (EEC N 235). Ha sido aprobado como aditivo alimentario en más de 40 países. La natamicina es activa contra levaduras y mohos, pero no contra bacterias, virus y protozoos (Te Welscher et al., 2010).

## MARCO TEÓRICO

---

### Principales técnicas de caracterización de materiales biopoliméricos

#### Propiedades de permeación

La permeación está determinada por una propiedad fundamental del film: la Permeabilidad. En condiciones de estado estable un gas difundirá a través de una película a velocidad constante, si la presión es mantenida constante a ambos lados de la misma.

El flujo de permeante  $J$ , es la cantidad que pasa a través de un plano normal al flujo, por unidad de área, por unidad de tiempo.

Definiendo  $Q$  cantidad de permeante:

$$J = \frac{Q}{A t} \quad (1.1)$$

La relación entre el flujo y el gradiente de concentración lo establece la ley de Fick, como una relación lineal, donde la constante de proporcionalidad es el coeficiente de difusión  $D$ . Utilizando la ley de Fick:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (1.2)$$

Cuando el sistema está en estado estable la ecuación anterior se puede integrar a través de todo el espesor de la película  $x$  a cuyos lados las concentraciones son  $c_1$  y  $c_2$ . Con  $D$  cte. e integrando:

$$Jx = -D(c_2 - c_1) \quad (1.3)$$

$$J = -D \frac{(c_2 - c_1)}{x} \quad (1.4)$$

Combinando las ecuaciones anteriores:

$$Q = -D \frac{c_2 - c_1}{x} A t \quad (1.5)$$

Cuando el permeante es un vapor o gas, es conveniente expresar las concentraciones como presiones parciales. Si las concentraciones son suficientemente bajas se puede aplicar la ley de Henry:

$$c = S p \quad (1.6)$$

Donde  $S$  es el coeficiente de solubilidad del permeante en la membrana del polímero

Combinando las ecuaciones anteriores:

$$Q = \frac{DS(p_1 - p_2)At}{x} \quad (1.7)$$

Definiendo el coeficiente de permeabilidad  $P$ , según Robertson, (2013) como:

$$P = DS \quad (1.8)$$

Remplazando en la anterior:

$$Q = \frac{P(p_1 - p_2)At}{x} \quad (1.9)$$

Despejando la permeabilidad  $P$  tenemos la ecuación del coeficiente de permeabilidad

$$P = \frac{Qx}{At(p_1 - p_2)} \quad (1.10)$$

Para el caso especial pero frecuente que el agua sea la sustancia permeante:

$$WVTR = \frac{Q}{At} = \frac{P}{x} \cdot (\Delta P) \quad (1.11)$$

Donde las unidades más frecuentes son :

Líquidos (sistema SI)

$WVTR = g / cm^2 \text{ día}$

Gases (sistema SI)

$$P = \text{cm}^3(\text{STP}) \text{ cm} / \text{cm}^2 \text{ s Pa}$$

### **Métodos experimentales de medición de permeabilidad**

#### Gases:

1. Método del incremento de presión:
  - Manométrico: ASTM 1434
2. Método isostático:
  - ASTM D 3985.
3. Medidores automáticos OX-TRAN

#### Vapor de agua:

Método cuasi -Isostático- gravimétrico, que será descrito en la parte de materiales y métodos.

### **Propiedades Mecánicas**

#### **Ensayo de tracción: esfuerzo y deformación**

El ensayo de tracción es uno de los más importantes para determinar las propiedades mecánicas de los materiales. Consiste en someter una pieza de forma cilíndrica o plana de dimensiones normalizadas a un esfuerzo de tracción continuo. Esta pieza se llama probeta.

Consideremos una probeta de longitud  $l_0$  y una sección  $A_0$  sometida a una fuerza  $F$  de tracción (perpendicular a la sección de la probeta). Se define esfuerzo o tensión ( $\sigma$ ) como la fuerza aplicada a la probeta por unidad de sección transversal  $A_0$ .

$$\sigma = F/A_0 \quad (1.12)$$

Sus unidades en el Sistema Internacional son  $\text{N/m}^2 = \text{Pascal}$

Supongamos que durante el ensayo la varilla se alargó a una longitud final  $l$ :

$$\Delta l = l - l_0 \quad (1.13)$$

$l$  = longitud final de la probeta,  $l_0$  = longitud inicial de la probeta.

Definimos deformación o alargamiento unitario ( $\epsilon$ ) de la probeta como el cociente entre el cambio de longitud o alargamiento experimentado y su longitud inicial.

$$\epsilon = (l - l_0)/l_0 = \Delta l/l_0 \quad (1.14)$$

### **Análisis de un diagrama de deformación**

Supongamos una probeta sometida a tracción cuyos resultados se representan en una gráfica. En abscisas la elongación o alargamiento ( $\Delta l$ ) y en ordenadas la fuerza aplicada ( $F$ ) que provoca la deformación.

Cada material tiene una gráfica distinta porque su comportamiento es distinto, pero en general un material presenta dos zonas en cuanto a su comportamiento ante un esfuerzo de tracción:

1. Zona elástica: Se caracteriza porque al cesar las tensiones aplicadas, los materiales recuperan su longitud inicial ( $l_0$ ).
2. Zona plástica: Se ha rebasado la tensión del límite elástico y, aunque se deje de aplicar tensiones de tracción  $\sigma_e$ , el material ya no recupera su longitud original

En la zona elástica hay, a su vez, dos zonas:

1. Zona de proporcionalidad: En la gráfica es una línea recta, es decir, el alargamiento unitario ( $\epsilon$ ) es proporcional a la tensión ejercida ( $\sigma$ ).

$$\sigma = \text{constante } \epsilon$$

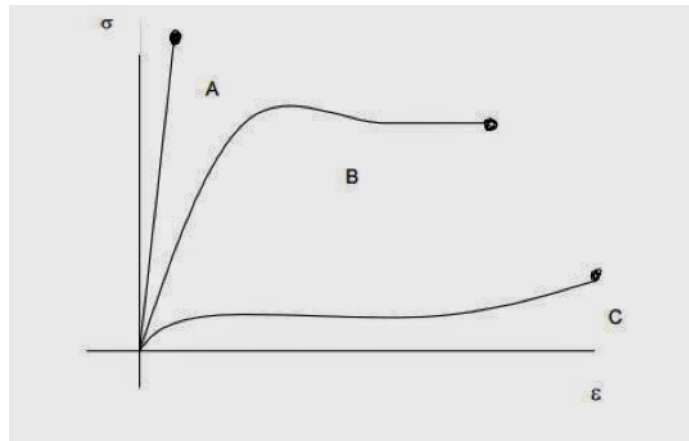
La constante se representa por la letra  $E$  y se llama módulo de elasticidad longitudinal o módulo de Young. En el sistema internacional, sus unidades son  $\text{N/m}^2$

2. Zona no proporcional: El material se comporta de forma elástica, pero no existe una relación proporcional entre tensión y deformación.

En la zona plástica hay, a su vez, otras dos zonas:

1. Zona de deformación plástica uniforme o zona de límite de rotura: Se consiguen grandes alargamientos con un pequeño incremento de la tensión. En el punto  $R$  existe el límite de rotura y la tensión en ese punto se llama tensión de rotura ( $\sigma_R$ ). A partir de este punto, la probeta se considera rota, aunque físicamente no lo esté.
2. Zona de rotura o zona de estricción o zona de deformación plástica localizada: Las deformaciones son localizadas y, aunque disminuya la tensión, el material se deforma hasta la rotura. En éste punto, la probeta se ha fracturado y la sección de la probeta se reduce drásticamente.

En la figura 1.6 se presentan las típicas curvas de tensión- deformación para materiales poliméricos.



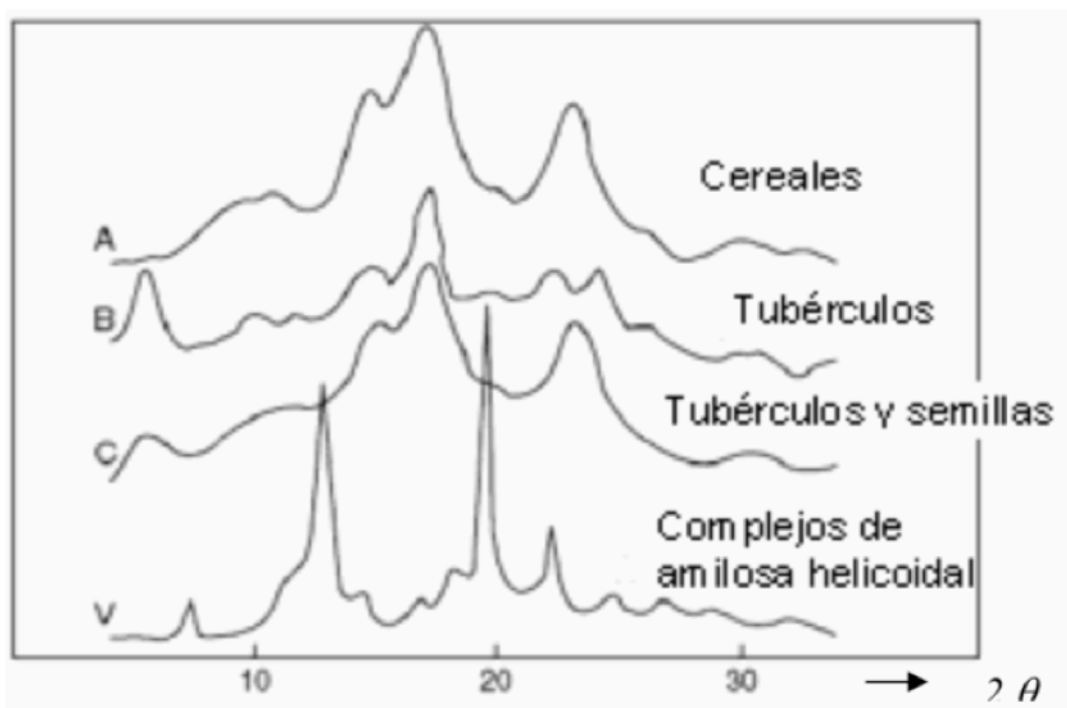
**Figura 1.6** Curvas para materiales poliméricos: A-Polímeros Frágiles, B-Materiales Plásticos (similar a los metales), C-Elastómeros

### Análisis de cristalinidad: difracción de rayos X

El almidón es un material semi-cristalino cuya estructura puede ser identificada a través de su patrón de difracción de rayos X. La Figura 1.7 muestra los cuatro principales tipos de patrones de difracción de los almidones nativos: A, B, C y V, cuyas características se encuentran representadas por los picos más sobresalientes de la siguiente manera:

- A, muestra 3 importantes picos a 5,8; 5,2 y 3,8 (Å), que corresponden a los 15,3°, 16,9° y 23,9° ( $2\theta$ ), respectivamente.
- B, muestra picos a 15,8° y 16,0° ( $2\theta$ ), equivalente a 4,0 Å y 5,9 Å, respectivamente; otro a 5,2 Å (de mayor intensidad); y un doblete de intensidad media a 4,0 y 3,7 Å (21,9° y 24,0°  $2\theta$ , respectivamente).
- C, es similar a A con la excepción de la adición de un pico a, aproximadamente, 16,0° ( $2\theta$ ).
- Para la forma V hidratada, aparecen picos a 12,0; 6,8 y 4,4 Å (8,9°, 13,0° y 20,1°  $2\theta$ , respectivamente).
- La forma deshidratada V, muestra picos d-espaciados de 11,3; 6,5 y 4,3 Å.





**Figura 1.7** Patrones de difracción A, B, C y V de los almidones nativos

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Otro instrumento utilizado para la observación y caracterización superficial de materiales es el microscopio electrónico debido a la gran profundidad de campo que es posible obtener. Este instrumento permite estudiar superficies de fractura, otorgando una visión interna del material.

Dentro de la familia de microscopios electrónicos, se encuentran el microscopio electrónico de transmisión (*TEM*) y el microscopio electrónico de barrido (*SEM*). El SEM provee información sobre morfología y características de la superficie y, a diferencia de la microscopía óptica, permite obtener una mayor resolución y profundidad de campo.

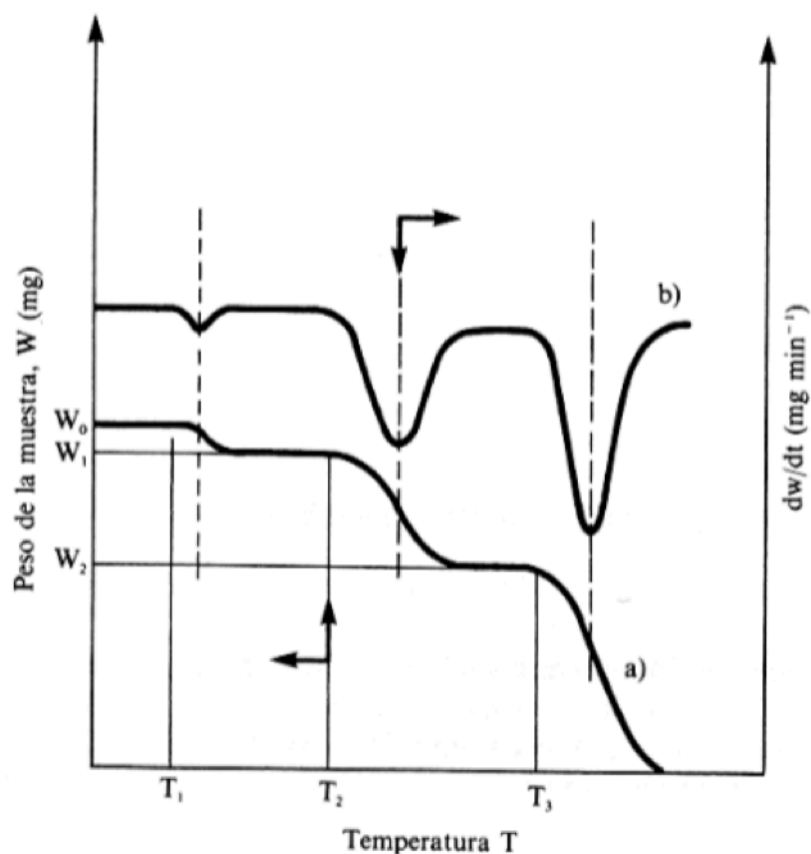
La microscopía SEM permite estudiar la morfología superficial de materiales, la compatibilidad de componentes en polímeros, los cambios morfológicos de materiales sometidos a tratamientos químicos y las formas de cristalización de materiales, entre otros.

## **Espectrofotometría infrarroja**

En el espectro de absorción de radiación infrarroja se pueden observar una serie de bandas asignadas a vibraciones, rotaciones y estiramientos de enlaces moleculares. Esto permite identificar y estudiar sustancias químicas. En este caso, la banda de adsorción se asocia a un grupo funcional y a la estructura molecular completa, aunque hay influencias estructurales que provocan desplazamientos significativos en la frecuencia de la vibración. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno (CH, OH, NH), o con dobles o triples uniones. Entre 1300 y 400  $\text{cm}^{-1}$  (denominada “*huella digital*”), se encuentra una zona dificultosa para la asignación de grupos funcionales determinados, debido a la multiplicidad de picos, sin embargo es una región muy útil para la identificación de compuestos específicos (Fama, 2008).

## **Propiedades térmicas**

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica utilizada para determinar la estabilidad térmica de un material y su fracción de componentes volátiles al monitorear el cambio de peso que se produce cuando una muestra se calienta a una velocidad constante. En un análisis de caracterización generalmente se registra de manera continua la masa de la muestra en estudio, como función del tiempo o la temperatura. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica; un esquema se puede observar en la Figura 1.8. Existen otros tipos de análisis denominados termogravimetría diferencial, donde se registran las variaciones de masa con respecto a la temperatura o respecto al tiempo dependiendo de que el experimento sea dinámico o isotérmico respectivamente (Skoog, Holler, & Crouch, 2007).



**Figura 1.8** Termogr ma diferencial (curva superior, eje derecho) y convencional (curva inferior, eje izquierdo) (Skoog, Holler, & Crouch, 2007)

### Almidón y resonancia magnética nuclear

Las aplicaciones de la RMN para la caracterización de alimentos se han generalizado desde los años ochenta. La espectroscopia de RMN es una herramienta analítica importante de la ciencia de los alimentos en los últimos años (Spyros & Dais, 2012). Esto se debe al desarrollo de una instrumentación fácil de usar, la necesidad de métodos analíticos efectivos para el control de calidad y la autenticación de alimentos, y las crecientes demandas de la industria alimentaria para innovar los procesos y productos. Algunos experimentos de RMN no requieren la separación de diversos componentes de los alimentos y requieren relativamente una pequeña cantidad de esfuerzos para el pretratamiento y la preparación de la muestra en comparación con los métodos tradicionales (Spyros & Dais, 2012). Las muestras de alimentos pueden ser lipídicas, semisólidas y sólidas. Los espectros de RMN complejos obtenidos pueden tratarse adicionalmente con análisis estadísticos multivariados para obtener información

estructural adicional de los sistemas alimentarios (Gidley, 2014). Las técnicas de RMN se han utilizado para probar diversos aspectos de los sistemas de almidón. Estas técnicas incluyen RMN  $^1\text{H}$  en estado líquido, RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^{31}\text{P}$  y RMN  $^{17}\text{O}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  CP / MAS en estado sólido. Varios aspectos / parámetros del almidón que se han estudiado por RMN incluyen la composición química, el grado de orden molecular, el grado de ramificación, el grado de gelatinización y retrogradación, la temperatura de transición vítrea, la estructura física de los complejos de inclusión de amilosa de tipo V, y la extensión y posición de modificación (Zhu, 2017).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Muchos de estos se comportan como pequeños imanes, generando un campo magnético débil. La ubicación de esos núcleos en una zona donde hay un campo magnético intenso  $B_0$  hace que los estados que difieren en la orientación de los momentos magnéticos nucleares posean diferente energía. De esta forma, si se irradia el sistema con la radiofrecuencia adecuada se producen transiciones entre niveles energéticos que son detectadas como señales de absorción.

Para que un elemento sea observable por RMN es necesario que el momento magnético de la muestra sea apreciable y que exista un spin nuclear ( $I$ ). Los núcleos que son observados frecuentemente por RMN tienen spin nuclear  $I=1/2$ :  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{103}\text{Rh}$  y  $^{195}\text{Pt}$ .

La técnica presenta unos parámetros espectrales característicos que sirven para la elucidación estructural de moléculas en disolución:

- Desplazamiento químico  $\rightarrow \delta$  (ppm): Posición de la señal en la escala del espectro. Depende del entorno electrónico del núcleo atómico que le da origen. Como norma general el número de señales es igual al número de entornos químicos distintos
- Intensidad: Área delimitada por las señales correspondientes a cada tipo de núcleo. También denominada como integral. La intensidad relativa de la señal es proporcional al número de protones que contribuyen a la señal.
- Sistemas de acoplamientos: Se encuentran definidos por:

a) Multiplicidad: Número de señales que origina cada tipo de componente (singlete, doblete, triplete, cuartete, multiplete). Se origina por el acoplamiento spin-spin y depende del número y naturaleza de los núcleos magnéticos separados hasta 3

enlaces del que origina la señal. La multiplicidad correspondiente a un núcleo o grupo de núcleos acoplados con  $n$  núcleos equivalentes de número cuántico de espín  $I=1/2$  viene dada por:

$$m=n+1$$

b) Constante de acoplamiento  $J$ : Distancia que existe entre los picos de los multipletes medida en Hertzios (Hz). La constante de acoplamiento escalar de dos núcleos separados por  $n$  enlaces se indica con  ${}^nJ$ , con un subíndice que indica el tipo de núcleos implicados. (Atkin, Cormier, & Callaghan, 2005).

c) Ancho de la señal: Con frecuencia está dominada por factores instrumentales como la inhomogeneidad del campo magnético  $B_0$ . También los fenómenos de relajación nuclear debido a interacciones intermoleculares afectan a la anchura de la señal.

## Experimentos de RMN

Para poder elucidar la estructura de las moléculas usando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se dispone de técnicas mono y bidimensionales. En este apartado, se desarrolla una breve descripción de los aspectos mas significativos de los diferentes espectros de RMN. Estos conceptos fueron tomados y adaptados del libro Basic NMR Experiments Technologies, (2013).

## Técnicas monodimensionales de RMN

### Espectro de ${}^1\text{H}$

En las moléculas orgánicas, por lo general, un protón está sujeto al campo magnético externo y a un campo magnético inducido por los electrones que lo rodean, generando diferentes efectos de apantallamiento, provocando distintas frecuencias de absorción. Estas variaciones se conocen como desplazamiento químico. En el espectro cada uno de los núcleos da origen a una única señal en función de su entorno químico. La mayoría de las señales se observan entre 0 y 12 ppm. El espectro de  ${}^1\text{H}$  se utiliza para deducir la estructura del esqueleto hidrocarbonado observando los entornos magnéticos de los hidrógenos. El desplazamiento químico de un protón depende de los grupos funcionales que lo rodean y, por lo tanto, es un indicador de la estructura local. La clasificación más amplia de desplazamiento químico tiende a dividir los protones en alifáticos, que

resuenan en regiones de campo alto en el espectro de RMN (ppm más bajos), típicamente  $<5$  ppm, y los protones aromáticos de desplazamiento químico más alto en regiones de campos bajos (ppm más altos) típicamente  $> 6.5$  ppm.

Existen muchas tablas de desplazamientos químicos comunes de RMN que subdividen estas en dos categorías más, por ejemplo, los alifáticos se pueden subdividir en protones de tipo metilo, metileno y metino. Además, existen programas de software que pueden, dada una entrada de estructura, predecir desplazamientos químicos de protones. El resultado de algunos de estos programas puede servir como una muy buena herramienta de referencia para la confirmación / aclaración de estructuras, particularmente con bases de datos que han sido seleccionadas por el investigador. En general, las estructuras pueden deducirse de los datos de desplazamiento químico, aunque no están implícitas. En otras palabras, el desplazamiento químico puede sugerir o ser consistente con una estructura propuesta, pero no constituye una prueba de estructura. Si el problema estructural requiere un alto grado de certeza, generalmente serán necesarios datos 2D adicionales.

El acoplamiento protón-protón a menudo se puede utilizar para proporcionar la primera información explícita sobre la estructura química. Los acoplamientos observados en los espectros de protones 1D generalmente son de naturaleza geminal (es decir, 2 enlaces,  $2J_H$ , H) o vecinales (es decir, 3 enlaces,  $3J_H$ , H). Las constantes de acoplamiento geminal suelen ser grandes ( $> 10$  Hz), a menos que estén atenuadas por átomos electronegativos cercanos. Los acoplamientos vecinales proporcionan información directa sobre cuántos protones están unidos a los carbonos vecinos y cuáles son distintos. Por ejemplo, un triplete nos dice que hay dos protones vecinos idénticos al de la señal de RMN, mientras que un patrón de doblete indica la presencia de dos protones adyacentes idénticos a los de los protones. Al analizar cuidadosamente los acoplamientos, se puede comenzar a esbozar la columna vertebral de la estructura química. Los patrones de acoplamiento pueden volverse rápidamente complejos, aunque existen programas de software para ayudar con la desconvolución y el análisis de múltipletes.

En particular, las constantes de acoplamiento vecinales se usan a menudo para distinguir entre configuraciones E y Z de alquenos, y también pueden proporcionar información sobre orientaciones axiales frente a ecuatoriales para protones en sistemas de anillos rígidos. Las dependencias de las constantes de acoplamiento se han establecido bien, especialmente para estos dos sistemas conformacionales, y generalmente son fáciles de

interpretar. Hay otras tendencias de acoplamiento protón-protón más atípicas que también pueden proporcionar información para la aclaración / confirmación de la estructura.

La integración de las señales de protones es un concepto simple que proporciona información química directa, es decir, el número de protones presentes bajo una determinada señal y finalmente en toda la molécula. Los valores integrales pueden volverse inexactos por varias razones, muchas de las cuales están bajo el control del investigador, y se debe tener cuidado para obtener los datos cuantitativos más confiables. Primero, el espectro de protones debe tener una relación señal / ruido (S / N) suficientemente alta. A continuación, se debe asegurar que la línea base sea lo suficientemente plana. Las señales grandes cerca de los protones que se están integrando (como el agua) pueden disminuir la precisión de la integración, por lo que es posible que sea necesario suprimirlas, como se realizará en varios experimentos del capítulo 2. Finalmente, la demora inter-scan total (duración del tiempo de adquisición más la demora de relajación) debe ser lo suficientemente larga como para permitir que los protones de interés se relajen de nuevo al equilibrio. La señal de RMN se genera inclinando la magnetización de la muestra en el plano xy con un impulso de radiofrecuencia. Esta magnetización regresa al eje z (que está alineado con el campo magnético de RMN) a través de un proceso llamado T1, red de espín o relajación longitudinal. Un retraso típico de escaneo interno de 3 s (tiempo de adquisición de 2s más un retraso de 1s relajación) y un ángulo de pulso de 45 segundos podrían proporcionar valores de integración con una precisión de ~ 90% para la mayoría de los protones, sin embargo, se pueden requerir tiempos más largos para algunos protones, o para lograr una mejor precisión. Las principales desventajas de la utilización de este experimento se producen cuando se intenta caracterizar moléculas complejas que presentan intrincados sistemas de giro, que generan multipletes solapados que conllevan a recurrir a RMN 2 D.

### **Espectro de Carbono desacoplado de protón $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$**

La espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  es menos sensible que la de  $^1\text{H}$ ; sólo el 1,1% de los átomos de carbono posee un spin nuclear activo además de una frecuencia de resonancia correspondiente a la cuarta parte de la de  $^1\text{H}$ . Los desplazamientos químicos del carbono varían del 0 a 250 ppm y las señales en el espectro se muestran como singletes, debido a

un desacoplamiento protónico de banda ancha, evitando el acoplamiento directo entre el  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ .

La RMN de  $^{13}\text{C}$  es complementaria a la de  $^1\text{H}$  y se utiliza para determinar el esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos del carbono.

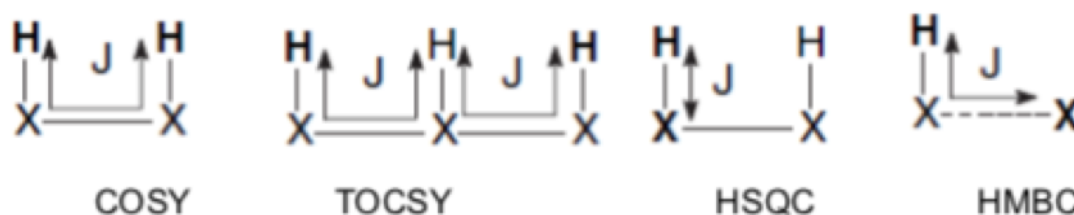
El experimento 1D de carbono es una herramienta comúnmente utilizada por los químicos orgánicos para la aclaración y confirmación de la estructura, ya que el cambio químico del carbono es altamente sensible a los grupos funcionales cercanos. El desacoplamiento de protones se usa tradicionalmente para colapsar las señales de carbono en líneas individuales, lo que tiene el doble beneficio de aumentar efectivamente la sensibilidad del experimento al tiempo que se simplifica el espectro. Sin embargo, el experimento requiere una cantidad relativamente grande de tiempo de muestra o espectrómetro en comparación con los experimentos detectados con protones, debido a la menor abundancia natural relativa del nucleido  $^{13}\text{C}$  y su receptividad reducida en comparación con  $^1\text{H}$ . Los experimentos de tipo HSQC son una forma más sensible y eficiente de obtener casi la misma información con respecto a los cambios químicos de carbono. Sin embargo, hay momentos en que un carbono 1D es el experimento apropiado. Por ejemplo, el HSQC no contiene información sobre los carbonos cuaternarios, solo los carbonos con protones unidos. Es muy probable que el experimento HMBC sea la primera opción para obtener datos de carbono cuaternario, ya que también se recibirá una gran cantidad de información de conectividad, pero habrá circunstancias en las que  $n\text{JH, C}$  será demasiado pequeña para observar la correlación. En estos casos, el espectro de carbono 1D puede ser la mejor opción para ver estas resonancias.

Otro momento en que el carbono podría ser una buena opción es cuando se necesita información cuantitativa. Aunque se necesita mucho cuidado para obtener datos cuantitativos de carbono, el espectro de carbono 1D puede ser la opción más directa. Finalmente, el espectro de carbono 1D tiene mucha más resolución en la dimensión de carbono que el HSQC 2D, lo que puede ser útil en algunas aplicaciones, como al estudiar muestras que tienen muchos carbonos con cambios químicos similares, como polímeros (caso del almidón) o ácidos grasos. Los experimentos de Carbono 1D son útiles cuando se cuenta con muestras altamente concentradas.



## Técnicas bidimensionales de RMN

Entre los diversos experimentos bidimensionales homo y heteronucleares que se pueden llevar a cabo, los que nos aportan mayor información se muestran en la Figura 1.9.



**Figura 1.9** Esquema de cada uno de los experimentos bidimensionales siendo X =  $^{13}\text{C}$

### Experimentos homonucleares

#### $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (COrrrelation SpectroscopY) y $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

Los experimentos homonucleares 2D a través de enlaces COSY y TOCSY, son a menudo las primeras piezas auxiliares de datos recopilados más allá del espectro de protones 1D para la aclaración / confirmación de la estructura. Debido a que estos experimentos son correlaciones protón-protón, son los más sensibles y tienen la mejor oportunidad de proporcionar datos estructurales adicionales más allá del espectro PROTON si la cantidad de muestra es limitada. Los espectros 2D homonucleares tienen una diagonal, que es efectivamente el espectro de protones 1D que se muestra como contornos, desde una perspectiva "topográfica". Las señales que no se encuentran en la diagonal se denominan picos cruzados, que se producen entre protones que comparten conectividad a través de enlaces, también llamado acoplamiento escalar. La información obtenida de estos datos indica qué protones están conectados a qué otros protones en el espectro de la 1D. Si bien podemos inferir algo de esta conectividad molecular a partir del espectro de protones 1D, los datos TOCSY y COSY transmiten esta información de una manera más obvia y fácil de interpretar, y también a menudo ayudan a resolver las señales que se superponen al protón 1D.

El experimento TOCSY generalmente se adquiere para proporcionar correlaciones entre un sistema de giro completo. Por ejemplo, si el protón A está acoplado a B, B acoplado

a C y C a D, los parámetros predeterminados del TOCSY deberían dar correlaciones entre todos los protones A-D. Los datos COSY, sin embargo, son de naturaleza escalonada, lo que significa que muestra un punto de cruce entre A y B, B y C, y C y D, pero ninguno entre A y C o D, o B y D. Ambos enfoques proporcionan información estructural muy útil y puede ser complementaria. Cuando una molécula tiene múltiples sistemas de espín aislados en la molécula pero superpuestos en el espectro 1D (como un péptido), los datos TOCSY son muy útiles para clasificar qué señales pertenecen a qué fragmentos estructurales. Los datos COSY, por otro lado, pueden distinguir qué protones están directamente acoplados entre sí dentro del sistema de espín. Cualquiera que sea el experimento utilizado, los datos de enlace a través de homonucleares 2D deben considerarse datos esenciales para la aclaración de estructuras de moléculas pequeñas para complementar los datos de  $^1\text{H}$ -RMN.

#### **NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy) y ROE (rotating-frame Overhauser enhancement)**

El experimento NOESY (espectroscopía de efecto nuclear Overhauser) es una herramienta excepcionalmente útil para dilucidar la estructura, ya que analiza las interacciones a través del espacio, a diferencia de otros experimentos que son a través del enlace. El experimento se utiliza para determinar si algún par de protones está cerca del espacio y genera un pico cruzado si se acercan dentro de aprox.  $<5$  Angstroms. Esto proporciona información para cosas como la estereoquímica relativa o la conectividad a través de heteronucleos como el oxígeno o el nitrógeno. El NOE es una mejora asignal que se genera a través de la relajación de espín dipolo-dipolo, análoga a la relajación T1 y T2. El NOE afecta los espines durante un retraso en la secuencia de pulso NOESY llamada tiempo de mezcla. El tamaño del NOE, por ejemplo, cuánto afecta a las alturas máximas, depende de la distancia entre los dos núcleos de interés. Las distancias más largas hacen que el NOE se acumule más lentamente, lo que a su vez requiere que el usuario use más tiempo de mezcla en el experimento para ver el efecto. La intensidad y el signo del NOE también dependen del tiempo de correlación de la molécula, que puede considerarse como una tasa de caída molecular. Depende de una serie de variables, que incluyen el tamaño y la forma de la molécula, la frecuencia del espectrómetro, la viscosidad del disolvente y la temperatura de la muestra. Las moléculas más pequeñas están en lo que se llama el límite de estrechamiento extremo, lo que significa que tienen frecuencias de correlación más altas e inhiben los NOE

positivos, con un valor máximo + 0,5 para las interacciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Esto significa que sus NOEs pueden cambiar las intensidades de señal en un máximo de + 50%. Las moléculas más grandes caen más lentamente, lo que significa que tienen frecuencias de correlación más bajas y inhiben los NOE negativos, con un efecto máximo de -1,0 para las interacciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . El cambio en el signo del NOE en función del peso molecular crea un problema para las moléculas de tamaño mediano, ya que significa que sus NOE medidos pueden ser cero, incluso si dos protones están cerca en el espacio. Por lo tanto, la falta de un efecto NOE no implica nada cuando se realizan aclaraciones de estructura: solo la presencia de un efecto NOE puede interpretarse y ser significativa. Para estas moléculas de tamaño intermedio, que generalmente comparten  $\sim 500$ - $2000$  MW, se debe utilizar el experimento ROESY para sortear el problema de los NOE cercanos a cero. El experimento ROESY utiliza un bloqueo de giro durante el tiempo de mezcla para mover el sistema dentro del límite de estrechamiento extremo y generar el ROE (mejora de Overhauser de marco giratorio). El ROE siempre es positivo, independientemente del tiempo de correlación, por lo que la magnitud del ROE nunca cruza a través de cero como el NOE. La desventaja de ROESY es que, para moléculas grandes, la magnitud del efecto ROE es normalmente menor que el efecto NOE, por lo que para pesos moleculares  $> 5000$ , NOESY se usa normalmente.

### **Experimentos heteronucleares**

#### **$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation):**

El espectro 2D resultante tiene desplazamientos químicos de protones a lo largo de un eje y desplazamientos químicos de carbono a lo largo del otro. Los picos cruzados indican que "el protón en el cambio químico X está unido a un carbono en el cambio químico Y". La ausencia de un pico cruzado para un protón particular indica que el protón no está unido a un carbono, lo que generalmente significa que está unido a un átomo de oxígeno o nitrógeno. Esta correlación protón-carbono puede ser extremadamente útil para la confirmación y aclaración de la estructura. Las asignaciones de picos se realizan fácilmente a partir de estos datos, y los resultados son inequívocos; Si se conoce una asignación de carbono particular, se puede asignar su protón adjunto, y viceversa. El conocimiento obtenido de la predicción del cambio químico de carbono también se puede aplicar a las asignaciones de protones con este tipo de datos. Cabe señalar que los conjuntos de datos de correlación protón-carbono no tienen diagonal, lo que contrasta con los experimentos 2D homonucleares comunes.

### **$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)**

Los experimentos de correlación de protón y carbono de enlace múltiple o de largo alcance dan cruces entre protones y carbonos que están separados por dos o más enlaces. Esta información se usa típicamente en la RMN de molécula pequeña para responder a las brechas estructurales a menudo esenciales que quedan después de analizar los datos de tipo COSY / TOCSY y HSQC. En particular, el experimento de tipo HMBC puede proporcionar una conexión clave entre sistemas de espín separados o carbonos cuaternarios difíciles de detectar. Por lo general, los experimentos de tipo HMBC son más sensibles que los espectros 1D  $^{13}\text{C}$  para detectar carbonos cuaternarios que están acoplados a un protón a menos de 4 enlaces de distancia. Sin embargo, las sensibilidades de estos experimentos varían ampliamente para diferentes correlaciones dentro de un conjunto de datos. Aunque HMBC podría no mostrar todas las correlaciones posibles cuando se usa en muestras concentradas sin ella, incluso un conjunto parcial de datos de correlación de largo alcance puede ser muy valioso para la aclaración de la estructura. La mayoría de estos experimentos se basan en la obtención de correlaciones de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a través de constantes de acoplamiento de largo alcance. En general, las constantes de acoplamiento de 3 enlaces ( $\sim 8$  Hz) son mayores que las constantes de acoplamiento de 2 enlaces ( $\sim 2$ -3 Hz) y, por lo general, tienden a proporcionar picos cruzados más fuertes cuando los parámetros experimentales están optimizados para 8 Hz. Sin embargo, se debe tener precaución al asignar estos picos cruzados más débiles como correlaciones de 2 enlaces únicamente a partir de su menor intensidad, ya que solo pueden identificarse definitivamente como "picos cruzados que se estabilizan a partir de constantes de acoplamiento más pequeñas". Sin embargo, existen experimentos modificados para distinguir entre correlaciones de 2 y 3 enlaces.

## OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

---

El objetivo del trabajo de tesis fue desarrollar un bio-recubrimiento activo basado en almidón, acetato de almidón de mandioca y fracciones de almidón de mandioca que mejore la vida útil de productos regionales, particularmente de quesos.

Para ello puntualmente se abordaron los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollar películas a partir de soluciones de: almidón, acetato de almidón, amilosa y amilopectina. Las películas de acetato de almidón son de alto grado de sustitución con agregado de plastificante.
2. Caracterizar fisicoquímica, estructural y morfológicamente los materiales desarrollados.
3. Caracterizar las películas obtenidas a través de la medida de sus propiedades térmicas, mecánicas, de transporte y de biodegradabilidad.
4. Estudiar el efecto del agregado de agentes activos a las películas desarrolladas, en la mejora de la vida útil de los productos a los que se aplicaron (quesos regionales).

## HIPÓTESIS

---

Es posible desarrollar un recubrimiento activo basado en almidón, acetato de almidón de mandioca y/o fracciones del almidón de mandioca, para preservar la calidad de alimentos, ya que el almidón y sus fracciones son filmogénicos, y sus modificaciones químicas mejoran las propiedades mecánicas y de permeación al vapor de agua de las películas generadas. El recubrimiento de alimentos regionales (quesos) con polímeros biodegradables derivados de almidón de mandioca que contengan agentes activos, permite prolongar la vida útil del producto, dado que se reduce la pérdida de agua, se condiciona el intercambio gaseoso con el medio y se retrasa el desarrollo microbiano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alrabadi, N. I. (2012). Shelf life extension of cheddar processed cheese using polyethylene coating films of nisin against bacillus cereus. *Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/jbs.2012.406.410>
- Alves, V. D., Mali, S., Beléia, A., & Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 941–946. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.007>
- Atkin, J. M., Cormier, R. J., & Callaghan, P. T. (2005). Time-dependence of nuclear magnetic resonance quadrupole interactions for polymers under shear. *Journal of Magnetic Resonance*. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2004.10.002>
- Auras, R. A., Harte, B., & Selke, S. (n.d.). Poly ( Lactic Acid ) Films as Food Packaging Materials.
- Cameron, R. E., & Donald, A. M. (1992). A small-angle X-ray scattering study of the annealing and gelatinization of starch. *Polymer*. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)91147-T](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)91147-T)
- Catalá, R., & Gavara, R. (1996a). Alternative high barrier polymers for food packaging. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/108201329600200501>
- Catalá, R., & Gavara, R. (1996b). Alternative high barrier polymers for food packaging. *Food Science and Technology International*, Vol. 2, pp. 281–291. <https://doi.org/10.1177/108201329600200501>
- Cerqueira, M. A., Sousa-Gallagher, M. J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.019>
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties

- of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.024>
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2007). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.004>
- Friedman, R. B., Hauber, R. J., & Katz, F. R. (1993). Behavior of starches derived from varieties of maize containing different genetic mutations. III. Effects of biopolymer source on starch characteristics including paste clarity<sup>1</sup>. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/07328309308019411>
- Fringant, C., Rinaudo, M., Foray, M. F., & Bardet, M. (1998). Preparation of mixed esters of starch or use of an external plasticizer: Two different ways to change the properties of starch acetate films. *Carbohydrate Polymers*, 35(1–2), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00250-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00250-6)
- Fringant, C., Rinaudo, M., Gontard, N., Guilbert, S., & Derradji, H. (1998). A Biodegradable Starch Based Coating to Waterproof Hydrophilic Materials. *Starch - Stärke*, 50(7), 292–296. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-379x\(199807\)50:7<292::aid-star292>3.3.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-379x(199807)50:7<292::aid-star292>3.3.co;2-r)
- García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2000). Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch/Staerke*. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200006\)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200006)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO;2-0)
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.003>
- Gidley, M. J. (2014). Starch NMR. *Starch Polymers: From Genetic Engineering to Green Applications*, 243–253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53730-0.00029-4>
- Hauser, C., & Wunderlich, J. (2011). Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating. *Procedia Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.031>
- Hoseney, R. C., Zeleznak, K. J., & Yost, D. A. (1986). A Note on the Gelatinization of Starch. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19860381203>
- Koontz, J. L., Marcy, J. E., Barbeau, W. E., & Duncan, S. E. (2003). Stability of

- Natamycin and Its Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf030333q>
- Korhonen, O., Kanerva, H., Vidgren, M., Urtti, A., & Ketolainen, J. (2004). Evaluation of novel starch acetate–diltiazem controlled release tablets in healthy human volunteers. *Journal of Controlled Release*, 95(3), 515–520. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2003.12.026>
- Liu, Z. (2005). Edible films and coatings from starches. In *Innovations in Food Packaging*. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50051-6>
- López, O. V., García, M. A., & Zaritzky, N. E. (2008). Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.023>
- López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041>
- Lourdin, D., Valle, G. Della, & Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00071-2)
- Lucera, A., Mastromatteo, M., Conte, A., Zambrini, A. V., Faccia, M., & Del Nobile, M. A. (2014). Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2013.10.002>
- Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>
- Miles, M. J., Morris, V. J., & Ring, S. G. (1985). Gelation of amylose. *Carbohydrate Research*. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90777-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90777-8)
- Mucha, M., & Pawlak, A. (2005). Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.08.014>
- Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2010). Isolation, structure, and characterization of the putative soluble amyloses from potato, wheat, and rice starches. *Carbohydrate Research*, 345(3), 449–451. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.11.021>
- Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2016). Starch edible film



- supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. *Food Control*.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.056>
- Ollé Resa, C. P., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.049>
- Ortega-Toro, R., Contreras, J., Talens, P., & Chiralt., A. (2015). Physical and structural properties and thermal behaviour of starch-poly(e{open}-caprolactone) blend films for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 5, 10–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.04.001>
- Pelissari, F. M., Yamashita, F., Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., & Grossmann, M. V. E. (2012). Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.004>
- Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.201000013>
- Protzman, T. Wagoner, J. (1964). |*Gelatinizad starch products*.
- Robertson, G. L. (2013). Food Packaging: Principles and Practice, Third Edition. In *Taylor & Francis Group*.
- Rumpold, B. a, & Knorr, D. (2005). Impact of high hydrostatic pressure on wheat, tapioca, and potato starches. *Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering*.
- Shogren, R. L., Swanson, C. L., & Thompson, A. R. (1992). f. *Starch - Stärke*.  
<https://doi.org/10.1002/star.19920440905>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). principles of instrumental analysis sixth edition. In *Principles of Instrumental Analysis*.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Spyros, A., & Dais, P. (2012). NMR spectroscopy in food analysis. *RSC Food Analysis Monographs*.
- Tarvainen, M., Peltonen, S., Mikkonen, H., Elovaara, M., Tuunainen, M., Paronen, P., ... Sutinen, R. (2004). Aqueous starch acetate dispersion as a novel coating material for controlled release products. *Journal of Controlled Release*, 96(1),

- 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.016>
- Tarvainen, M., Sutinen, R., Peltonen, S., Mikkonen, H., Maunus, J., Vähä-Heikkilä, K., ... Paronen, P. (2003). Enhanced film-forming properties for ethyl cellulose and starch acetate using n-alkenyl succinic anhydrides as novel plasticizers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(5), 363–371. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00137-4)
- Te Welscher, Y. M., Jones, L., Van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., De Kruijff, B., Eitzen, G., & Breukink, E. (2010). Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01794-09>
- Technologies, A. (n.d.). *Agilent Basic NMR Experiments Familiarization Guide*.
- Tharanathan, R. . (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Ture, H., Eroglu, E., Ozen, B., & Soyer, F. (2011). Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02465.x>
- Yang, Z., Chaib, S., Gu, Q., & Hemar, Y. (2017). Impact of pressure on physicochemical properties of starch dispersions. *Food Hydrocolloids*, 68, 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.032>
- Zhu, F. (2017). NMR spectroscopy of starch systems. *Food Hydrocolloids*, 63, 611–624. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.015>

## CAPÍTULO 2

*Preparación y caracterización de materiales: almidón de mandioca y acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución*

---

## INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años, el interés en encontrar alternativas ecológicas para el material plástico no degradable derivados de petróleo, ha llevado a muchos investigadores a poner énfasis en los materiales poliméricos naturales de origen agrícola. El almidón ha sido una de las mejores alternativas porque es un material renovable, de bajo costo y compatible con el medio ambiente. Su principal inconveniente es que, en su estado nativo es muy sensible a la humedad.

La mandioca (*Manihot Esculenta*) es un cultivo nativo de la América tropical. Se cultiva en diferentes regiones de América, Asia y África. Entre los almidones, la mandioca destaca por su bajo precio y amplia disponibilidad en estas regiones. Varios autores investigaron el uso potencial del almidón de mandioca como matriz polimérica en la producción de películas (Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2005; Seligra, Medina Jaramillo, Famá, & Goyanes, 2016). Como un material polimérico biodegradable, el almidón acetilado también tiene usos potenciales en aplicaciones farmacéuticas, industrias alimentarias y otras aplicaciones nuevas. (Zhang, Xie, Zhao, Liu, & Gao, 2009).

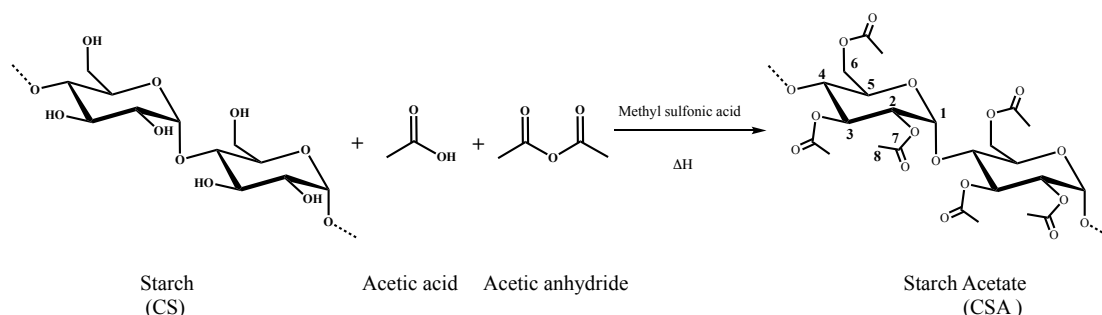
La modificación química del almidón está directamente relacionada con las reacciones de los grupos hidroxilo del polímero de almidón. Las reacciones de eterificación, formación de ésteres, la oxidación y la hidrólisis de los grupos hidroxilo, son algunas modificaciones químicas aplicables al almidón. Entre estos, la acetilación se puede realizar con relativa facilidad para mejorar significativamente las propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón. (Jarowenko, 1986; Singh, Kaur, & McCarthy, 2007).

Durante la reacción de acetilación, los tres grupos hidroxilo libres en C2, C3 y C6 en la molécula de almidón pueden sustituirse con un grupo acetilo. Por lo tanto, el máximo grado teórico de sustitución (DS) es 3 (Xu, Miladinov, & Hanna, 2004).

Se han descrito varios métodos para lograr la acetilación química del almidón, de bajo y medio grado de sustitución. Algunos incluyen la acetilación en un medio básico, para obtener bajos grados de acetilación, que dan como resultado productos hidrofílicos y se utilizan en la industria alimentaria. Ayucitra (2013) usó un medio básico para preparar acetatos de almidón con DS 0.8-0.21. Randal L. Shogren (1996) usó NaOH como catalizador para preparar acetatos de almidón con grados intermedios de sustitución. Mark & Mehlretter, (1972) desarrolló un método que usaba NaOH como catalizador

para preparar triacetato de almidón de grados intermedios, realizando la sustitución nucleófila en un átomo de carbono insaturado de anhídrido acético, mediante un mecanismo de eliminación por adición. Shogren (2003) usó ácido acético glacial y ácido acético anhídrido a bajos volúmenes de reacción para obtener acetatos con DS entre 0,5 y 2,5, a temperaturas elevadas (160 °C a 180 °C).

Un proceso de acetilación en medio ácido, usando anhídrido acético y ácido acético en presencia de ácido metilsulfónico como catalizador (Figura 2.1) fue propuesto por Feuer (Patente No. 5710269, 1998). Este método permite obtener altos grados de sustitución con condiciones de reacción menos rigurosas que otros procedimientos.



**Figura 2.1** Reacción química de acetilación en medio ácido

Numerosos investigadores estudiaron el efecto de la acetilación sobre las propiedades de los acetatos de bajo y medio grado de sustitución. Singh, Kaur & Singh, (2004) estudiaron el efecto del anhídrido acético sobre las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y térmicas de almidón de papa y maíz en un rango de DS 0,133-0,206. El efecto de la acetilación del almidón de diferentes cultivares de arroz en un rango de DS 0,107 y 0,144 fue estudiado por Sodhi & Singh, (2005). López, Zaritzky & García, (2010) caracterizaron los almidones de maíz con diferentes modificaciones químicas, incluido el almidón acetilado de DS hasta 0,011. Colussi et al., (2014) estudiaron el efecto de la acetilación sobre las propiedades del almidón de arroz de baja, media y alta amilosa, obteniendo acetatos con  $0,24 < DS < 0,43$  y concluyeron que la acetilación reducía la cristalinidad del almidón de arroz, al tiempo que incrementaba la estabilidad térmica de los materiales obtenidos.

Mbougung, Tenin, Scher, & Tchiégang, (2012) estudiaron la influencia del tiempo de acetilación en las propiedades fisicoquímicas, funcionales y térmicas de los acetatos de almidones de mandioca y de papa en un rango de DS inferior a 0,26. Osundahunsi, Seidu & Mueller, (2014) estudiaron el efecto del anhídrido acético en la reacción de

acetilación de dos especies de mandioca en el rango de DS entre 0,03 y 0,213, encontrando que a medida que el DS, la solubilidad y el hinchamiento se incrementan.

Luo & Shi, (2018), estudiaron el patrón de sustitución de grupos acetilo en diferentes almidones, variando la concentración del catalizador NaOH para el mismo DS encontraron que una alta concentración de catalizador conduce a la acetilación indistinta en ambas regiones del almidón, la zona cristalina y la amorfa.

Chi et al. (2008) estudiaron la acetilación del almidón de maíz en el rango de 0,89-2,89, utilizando  $^1\text{H}$ -RMN y valoración química para calcular el DS, obteniendo una buena correlación de resultados por ambos métodos.

Zhang et al., (2009) realizan la acetilación en medio ácido de almidón de jengibre amarillo, obteniendo DS entre 0,09-2,67, encontrando una relación proporcional positiva entre el aumento de DS y la estabilidad térmica del almidón.

Laignel, Bliard, Massiot & Nuzillard (1997) estudiaron el uso de experimentos  $^1\text{H}$ -NMR, COSY y HOHAHA, triacetato de amilosa y malto-oligosacáridos acetilados de DS = 2,63 y DS = 2,74, logrando una completa elucidación de sus estructuras químicas. Se dirigieron pocas investigaciones para lograr la síntesis de almidones con alto DS e investigar la influencia de la acetilación en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de diferentes orígenes botánicos y no se han encontrado trabajos de caracterización específicamente de acetato de almidón de mandioca de alto grado de acetilación.

En este contexto, el propósito del presente trabajo fue lograr altos grados de acetilación del almidón de mandioca nativo, mediante un método simple y escalable, para obtener un compuesto altamente hidrofóbico y determinar las características morfológicas, fisicoquímicas y estructurales del compuesto obtenido, que podría tener aplicaciones como material de recubrimiento y embalaje alternativo (ecológico).

Las propiedades del acetato sintetizado se estudiaron con un enfoque integral utilizando técnicas diferentes y complementarias. Así, el grado de sustitución, la caracterización de la estructura química y la morfología se investigaron mediante análisis químico, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), microscopía electrónica de barrido (SEM) y resonancia magnética nuclear (RMN).

En este capítulo, el interés se centró en la caracterización estructural completa del almidón de mandioca y el éster de almidón nativos utilizando el análisis 1D-RMN y

2D-RMN; ya que esta información no se encontró en la literatura consultada. El foco fue, a diferencia de otros trabajos que utilizan  $^1\text{H}$ -RMN, la utilización de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ -NMR cuantitativo que genera menos superposición de señales, permite un cálculo más preciso y detallado del DS y proporciona información sobre la posición más favorable de acetilación. Por otro lado, por  $^1\text{H}$ -RMN, se calculó el grado de ramificación del almidón de mandioca nativo, no informado hasta ahora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Materiales

Almidón de mandioca comercial fue proporcionado por Aldema (Misiones, Argentina), el agua fué agua ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU.), y anhídrido acético, ácido acético glacial y metanol fueron de calidad analítica comprados a Cicarelli SA (Santa Fe, Argentina), ácido metilsulfónico fue proporcionado por Merck Millipore (Burlington, MA, EE. UU.) y DMSO- $d_6$  (99,5% de átomos de D) y TFA- $d_1$  (99% de átomos de D) se compraron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EE. UU.) y se usaron tal como se recibieron.

### Síntesis de acetato de almidón de mandioca

#### Método en medio ácido

Para la síntesis de acetato de almidón de mandioca de alta sustitución, se utilizó una modificación del método de Feuer (Patente No. 5710269, 1998), que propone una reacción en medio ácido con ácido metilsulfónico como catalizador.

El almidón, cuyo porcentaje de humedad es aproximadamente del 11%, se secó previamente en estufa a 60 °C durante la noche. Se mezclaron 30 g del mismo con 54 mL de anhídrido acético y 55 mL de ácido acético glacial. Luego, el catalizador de esterificación, ácido metilsulfónico (MSA), diluido en ácido acético, se añadió lentamente durante un período de 10 minutos, y posteriormente la mezcla se calentó y se mantuvo entre 80 °C y 95 °C en 30, 90 y 120 minutos.

Al final, se añadió agua destilada fría (5-6 °C) a la solución para detener la reacción y precipitar el acetato de almidón. El precipitado blanco obtenido se lavó 2 veces con agua destilada y una con metanol, se secó en estufa a 40 °C durante 24 horas y se almacenó en un desecador a temperatura ambiente.

### **Determinación del grado de sustitución mediante valoración química por retorno**

El grado de sustitución del acetato de almidón se determinó mediante titulación de retorno utilizando el método de Miladinov & Hanna, (2000). Se colocó una cantidad de 0,5 g de almidón acetilado en un recipiente de 250 mL con agua destilada (50 mL) y se ajustó el pH a 7 con HCl 0,02 N. Luego se agregaron 25 mL de NaOH 0,5 N y la mezcla se calentó en un calefactor de placa con agitación vigorosa hasta obtener una solución transparente. El exceso de NaOH se valoró de nuevo a pH 7 con HCl. El DS se calculó como Xu, et al., (2004):

$$\text{Grado de Sustitución (DS)} = \frac{162 * (N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}} - N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}})}{1000 * W - 42 * (N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}} - N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}})} \quad (2.1)$$

donde  $N_{\text{NaOH}}$  es la normalidad de NaOH,  $V_{\text{NaOH}}$  es el volumen de NaOH,  $N_{\text{HCl}}$  es la normalidad de HCl usado para valorar por retorno,  $V_{\text{HCl}}$  era el volumen de HCl usado.

### **$^1\text{H}$ -RMN de almidón nativo y acetato de almidón de mandioca**

Todos los experimentos de  $^1\text{H}$  se registraron en instrumentos Agilent de 500 MHz (LTI Universidad de Valladolid, España). Las muestras para RMN de almidones se prepararon de la siguiente manera: se colocaron 15 mg de almidón nativo o de almidón modificado (de cada muestra) en un vial pequeño y se agregaron 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{DMSO-}d_6$  y luego se transfirieron a un tubo de RMN. Los parámetros de adquisición fueron: 70  $^{\circ}\text{C}$ , retraso de relajación de 10 s entre transitorios, ancho de pulso de 45 $^{\circ}$ , ancho espectral de 8012.8 Hz, se hicieron un total de 32 transitorios con tiempo de adquisición de 2.044 s. Los desplazamientos químicos de la señal de RMN ( $\delta$ ) se informan en partes por millón (ppm) y se refirieron al tetrametilsilano (TMS), utilizando el pico de disolvente residual como referencia interna. Los espectros finales se manipularon y procesaron utilizando el software Mestrelab Research (MNova 12.0).

### **$^{13}\text{C}$ -RMN de almidón nativo y acetato de almidón de mandioca**

Todos los experimentos de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN se registraron en instrumentos Agilent de 500 MHz equipados con sonda OneNMR (LTI Universidad de Valladolid, España). Las muestras de RMN de almidones se prepararon de la siguiente manera: se colocaron 50 mg de almidón nativo o 125 mg de almidón modificado (de cada muestra) en un vial



pequeño y se agregaron 750  $\mu\text{L}$  de DMSO- $d_6$  y luego se transfirieron a un tubo de 5 mm de RMN. Para obtener la medición de los espectros cuantitativos de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN para el almidón modificado, se utilizó la técnica de desacoplamiento inversa cerrada para suprimir el efecto Overhauser nuclear (NOE). Los parámetros de adquisición para el almidón nativo fueron: 70 °C, 1 s de retraso de relajación entre transitorios, 45 ° de ancho de pulso, ancho espectral de 31250 Hz, con un total de 23280 transitorios y 1,048 s de tiempo de adquisición. Para obtener la medición de los espectros cuantitativos de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN para el almidón modificado, también se utilizó la técnica de desacoplamiento inversa cerrada para suprimir el efecto Overhauser nuclear (NOE). Los parámetros de adquisición fueron: 70 °C, retraso de relajación de 10 s entre transitorios, ancho de pulso de 60 °, ancho espectral de 31250 Hz, con un total de 6200 transitorios y tiempo de adquisición de 1,048 s. Los desplazamientos químicos de la señal de RMN ( $\delta$ ) se expresan en (ppm) y se refieren a la señal del tetrametilsilano (TMS). Los espectros finales se manipularon y procesaron utilizando el software Mestrelab Research (MNova 12.0).

### **Resonancia Magnética Nuclear bidimensional**

Las asignaciones de picos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron utilizando métodos de RMN 2D (gCOSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -ROESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC). Para los experimentos 2D heteronucleares (HSQC y HMBC) con selección de coherencia de gradiente, se utilizó CRISIS1 con pulsos BIP (impulso de inversión de banda ancha) en los canales  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ .

El gradiente CRISIS2 HSQC (gc2hsqc) se registró a 70 °C, con detección inversa y desacoplamiento de carbono durante la adquisición en el modo sensible a la fase. Se usó un valor nominal de 146 Hz para las constantes de acoplamiento de un enlace JCH. Las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hz. Las abreviaturas estándar se utilizan para indicar la multiplicidad: s = singlete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete. Se recolectaron un total de 2 transitorios para cada uno de los 400  $t_1$  incrementos, utilizando anchos espectrales de 3156 Hz en la dimensión F2 y 11310 Hz en la dimensión F1. Los datos fueron apodizados con ventanas gaussianas en ambas dimensiones. Se empleó la predicción lineal hacia adelante para mejorar la resolución digital en las dimensiones F1 de todos los experimentos 2D. Los espectros finales se manipularon y procesaron utilizando el software MNova (ver. 12.0).

### Determinación del grado de ramificación de almidón nativo de Mandioca

El grado de ramificación (% DB), que representa el porcentaje de ramificaciones (enlaces  $\alpha$ -1,6) con respecto al número total de enlaces anoméricos presentes en el almidón y el número promedio de unidades de glucosa en la cadena (CLn), se calculó a partir de las ecuaciones descritas por Nilsson, Bergquist, Nilsson & Gorton, (1996):

$$\text{Grado de ramificación (\%DB)} = \frac{A(H-1(1 \rightarrow 6)) * 100}{A(H-1(1 \rightarrow 4)) + A(H-1(t)) + A(H-1(1 \rightarrow 6))} \quad (2.2)$$

$$\text{Promedio CLn} = A(H-1(1 \rightarrow 4)) + A(H-1(t)) + A(H-1(1 \rightarrow 6)) \quad (2.3)$$

Donde A (H-1 (1  $\rightarrow$  4)) representa el área de la señal de los protones anoméricos involucrados en un enlace (1-4) correspondiente a la cadena lineal. A (H-1 (1  $\rightarrow$  6)) representa el área de la señal de los protones anoméricos involucrados en un punto de ramificación y A (H-1 (t)) representa la señal originada por un extremo terminal no reductor.

### Determinación del Porcentaje de amilosa por $^1\text{H}$ -RMN del almidón nativo

La determinación del porcentaje de amilosa fue calculado según la ecuación descripta por Dunn & krueger (1999):

$$B = F_1 * b_1 + F_2 * b_2 \quad (2.4)$$

Donde B es el radio a (( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4)/ ( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6)) del almidón cuya concentración de amilosa se desea calcular,  $b_1$  es la relación (( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4)/ ( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6)) de amilopectina fijado en 19 para almidón ceroso.  $F_1$  es la fracción de amilopectina en el almidón,  $b_2$  es la relación (( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4)/ ( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6)) de amilopectina fijado en 203,7 para amilomaiz y  $F_2$  la fracción de amilosa presente en el almidón.

### Determinación del grado de sustitución mediante $^1\text{H}$ -RMN de almidones acetilados

La espectroscopía  $^1\text{H}$ -RMN se puede usar como una herramienta fácil y precisa para el análisis del grado de sustitución del almidón acetilado, mediante la ecuación descrita por De Graaf (1995):

$$DS = \frac{I_A}{3I_{AGU}} \quad (2.5)$$

Donde  $I_A$  es el área del pico de RMN del grupo acetilo del acetato de almidón y  $I_{AGU}$  es el área del pico de RMN de las unidades de anhidroglucosa del protón ecuatorial del almidón. Este área de pico se multiplica por 3 debido a que hay tres sitios reactivos en una unidad de anhidroglucosa

### **Determinación del grado de sustitución mediante $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN cuantitativo de almidones acetilados. Identificación del patrón de sustitución regioselectivo**

El experimento  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN cuantitativamente evaluable permite un cálculo más confiable del grado de sustitución (DS) permitiendo también una descripción más detallada del producto obtenido, diferenciando entre las tres posibles posiciones de sustitución disponibles de la unidad de anhidroglucosa, es decir, aquellas que se producen en los carbonos C6, C2 y C3.

El grado parcial de sustitución posible en cada una de las posiciones, varía entre 0 y 1 y la suma de ellas constituye el DS. Al obtener la fracción individual  $X_i$  para cada carbono, es posible determinar el grado parcial de sustitución para cada posición como:

$$X_i = \frac{A(C_{is})}{A(C_{is} + C_{ius})} \quad (2.6)$$

Donde el sufijo (s) representa el C sustituido y el sufijo (us) el carbono no sustituido, y (i) representa los valores para C6, C3 y C2.

El DS y se calcula como:

$$DS = X_6 + X_2 + X_3 \quad (2.7)$$

### **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Los análisis FTIR se realizaron utilizando un espectrómetro Jasco FT-IR 4100 (Japón) equipado con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR, cristal ZnSe) localizado en el LPYMC, IFIBA- UBA. Los espectros se registraron en un rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  como el promedio de 64 exploraciones con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Análisis Termogravimétrico**

Las propiedades térmicas se estudiaron mediante análisis simultáneo termogravimétrico/ diferenciales Shimadzu DTG-60 (Japón) localizado en el LPYMC, IFIBA- UBA. Se colocaron muestras de 5 mg de cada muestra (polvo) en bandejas de aluminio en el balanza del equipo. Las pruebas se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno (caudal de 30 ml / min) de 30 a 450 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La morfología del almidón nativo y los acetatos de almidón se observaron utilizando SEM Hitachi S-3000N, (Tokio, Japón) localizado en el Laboratorio CELLMAT, Universidad de Valladolid, España. Antes de la prueba, las muestras se montaron en los talones SEM con cintas adhesivas de doble cara y luego se recubrieron con platino al vacío para que la muestra fuera conductora a un voltaje de aceleración de 15 kV. Las microfotografías de barrido electrónico se registraron con aumentos de 1000 y 2000X.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

### **Síntesis de acetato de almidón de mandioca**

Al modificar la variable tiempo de reacción, se obtuvieron acetatos de almidón de mandioca (AAM) con diferentes DS (Figura 2.2). Los valores promedio de DS medidos por titulación para tiempos entre 30 y 120 minutos se muestran en la Tabla 2.1. Los datos mostrados representan valores medios de las determinaciones por triplicado  $\pm$  la desviación estándar. El DS aumentó con el tiempo de reacción de 30 a 120 minutos; sin embargo, este incremento no fue lineal. Los datos se representan mejor mediante un ajuste a una ecuación de segundo orden. Esto, probablemente fue una consecuencia del efecto favorable del tiempo en la difusión y adsorción de los grupos acetilo en las moléculas de almidón, debido a una mayor desestructuración del granulo de almidón (Khalil, Hashem & Hebeish, 1995).



**Figura 2.2** Síntesis de acetato de alto grado

**Tabla 2.1.** Valores de DS medidos por titulación para diferentes tiempos de reacción.

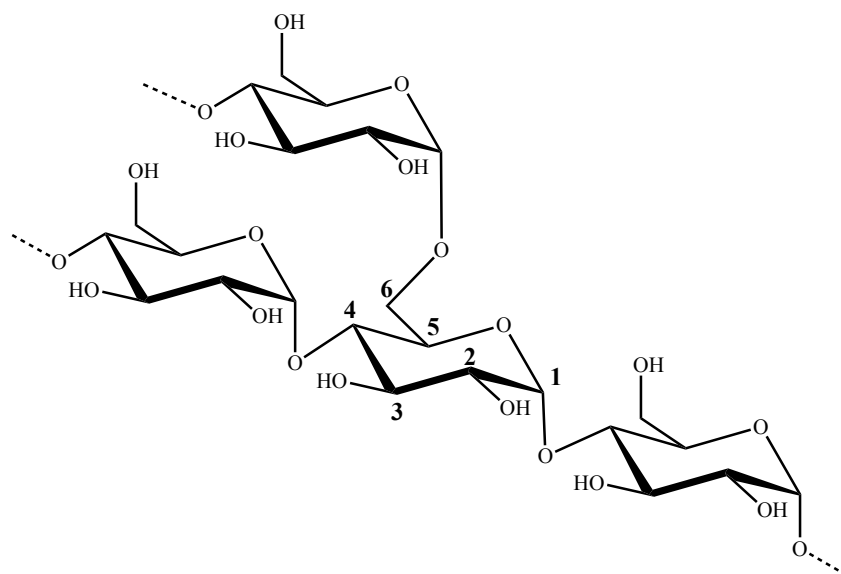
<i>Muestra</i>	<i>Tiempo de reacción (min)</i>	<i>DS Calculado</i>
CSA30	30	$1.9^a \pm 0.1$
CSA90	90	$2.4^b \pm 0.2$
CSA120	120	$2.9^c \pm 0.1$

Los valores son promedios de análisis por triplicado.

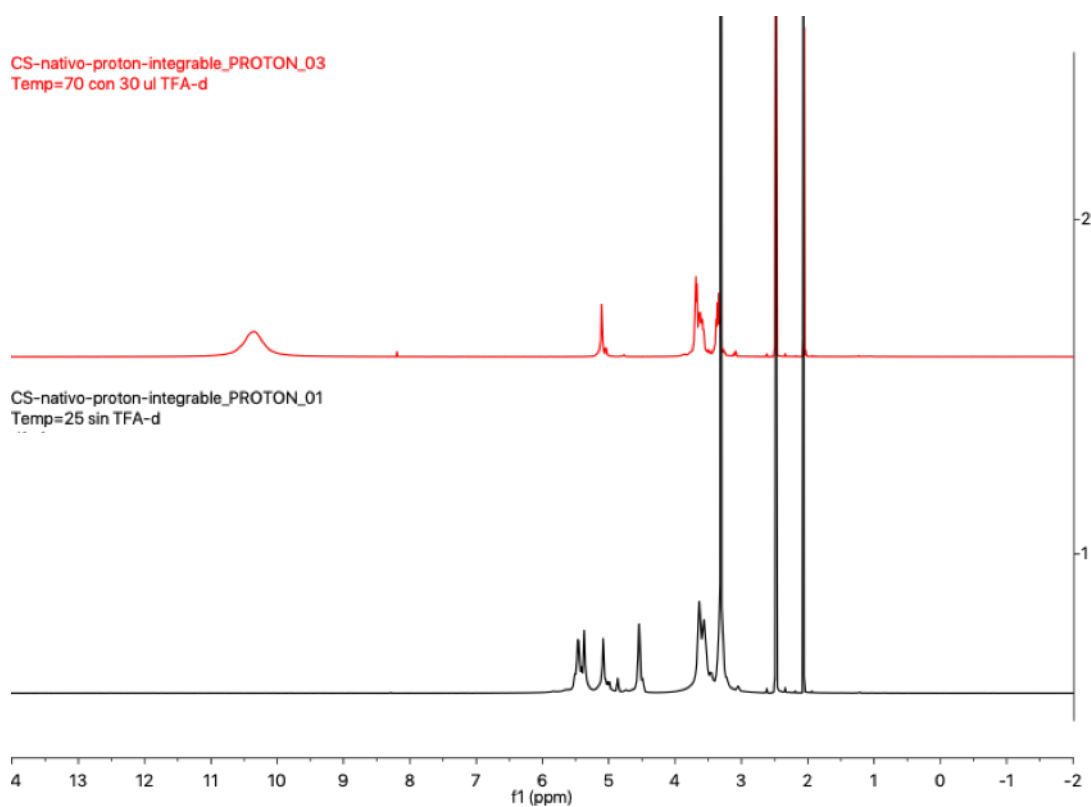
Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores con un nivel de confianza del 95%.

### **<sup>1</sup>H-RMN de almidón nativo de mandioca**

Caracterización del almidón de mandioca nativo: después de la adición de 30  $\mu$ L de TFA- $d_1$  sobre la muestra disuelta en DMSO- $d_6$ , los protones que pertenecen al agua residual del solvente deuterado y los grupos OH del almidón nativo presentaron un intercambio rápido con el deuterio de TFA- $d_1$ , que dió lugar a un solo pico a 10.38 ppm, un resultado similar al encontrado por Tizzotti, Sweedman, Tang, Schaefer & Gilbert, (2011). En la Figura 2.3 puede apreciarse la estructura química del almidón nativo de mandioca, mientras que en la 2.4. se aprecia el espectro de protón para el almidón nativo con y sin el agregado de TFA- $d_1$



**Figura 2.3** Estructura del almidón nativo de Mandioca

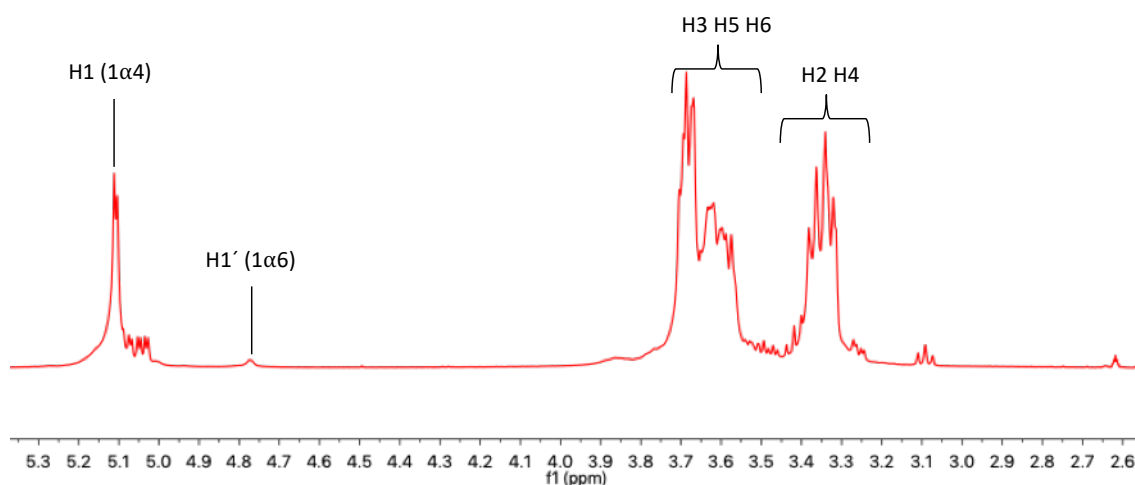


**Figura 2.4**  $^1\text{H}$ -RMN, en DMSO a 70 °C de almidón nativo de Mandioca con y sin TFA- $d_1$

Las señales de los protones anoméricos H1 y H1' correspondientes a los enlaces internos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 se observaron a 5.13 y 4.79 ppm, respectivamente. Las señales

correspondientes a los protones de anhidroglucosa del almidón H3, H5 y H6 aparecieron en la región comprendida por 3.57-3.76 ppm y las señales de H2 y H4 entre 3.32-3.44 ppm como puede observarse en la Figura 2.5.

CS-nativo-proton-integrable\_PROTON\_03  
Temp=70 con 30 ul TFA-d

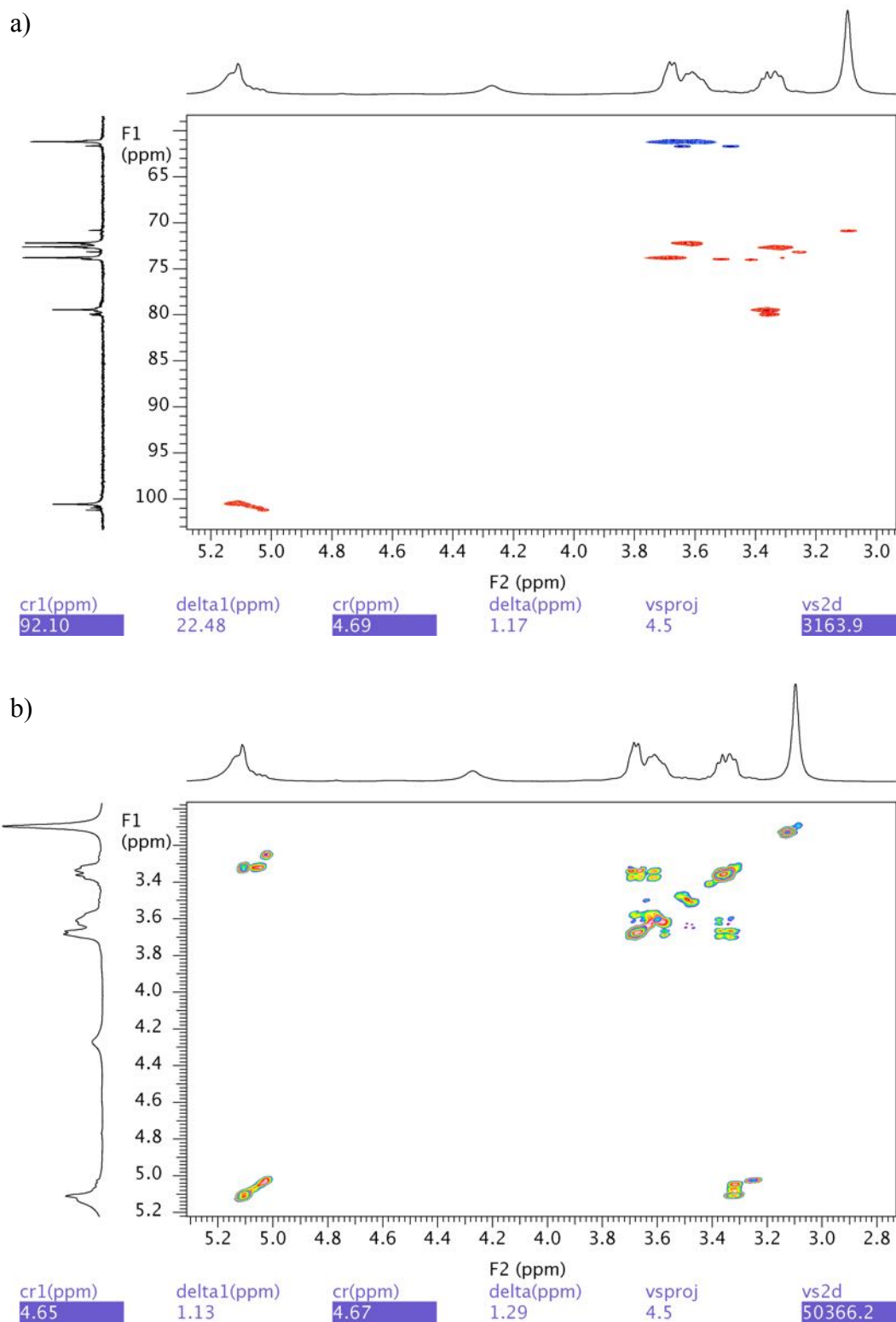


**Figura 2.5** Asignación de picos para almidón nativo mediante  $^1\text{H}$ -RMN, en DMSO a 70 °C con TFA- $d_1$

Los protones anoméricos H1 y H1' se resolvieron bien, evitando la superposición con las señales desplazadas a otras resonancias (grupos hidroxilo), después de la adición de TFA- $d_1$ , permitiendo una integración clara y reduciendo el error asociado. Por lo tanto, se pudieron hacer cálculos confiables y reproducibles de señales de protones anoméricos.

### Resonancia Magnética Nuclear bidimensional

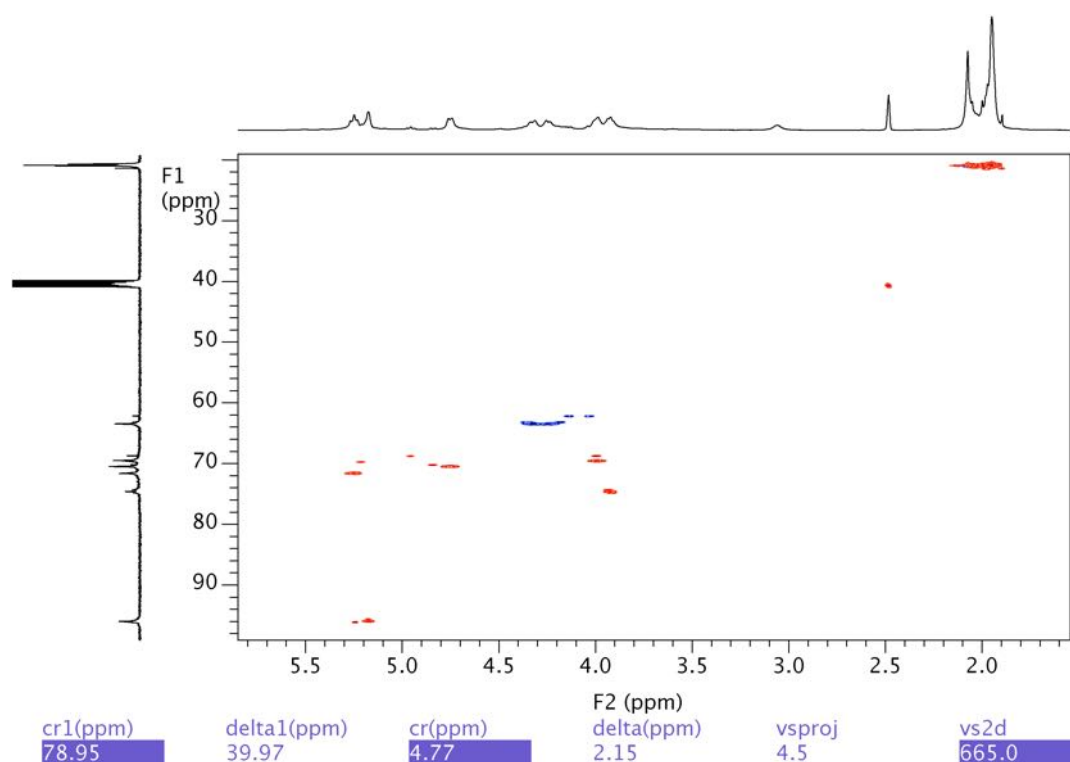
En la Figura 2.6 se puede observar los espectros bidimensionales COSY, y HSQC realizados a 70 °C de almidón nativo de mandioca con el objetivo de establecer la caracterización completa estructural del almidón nativo.



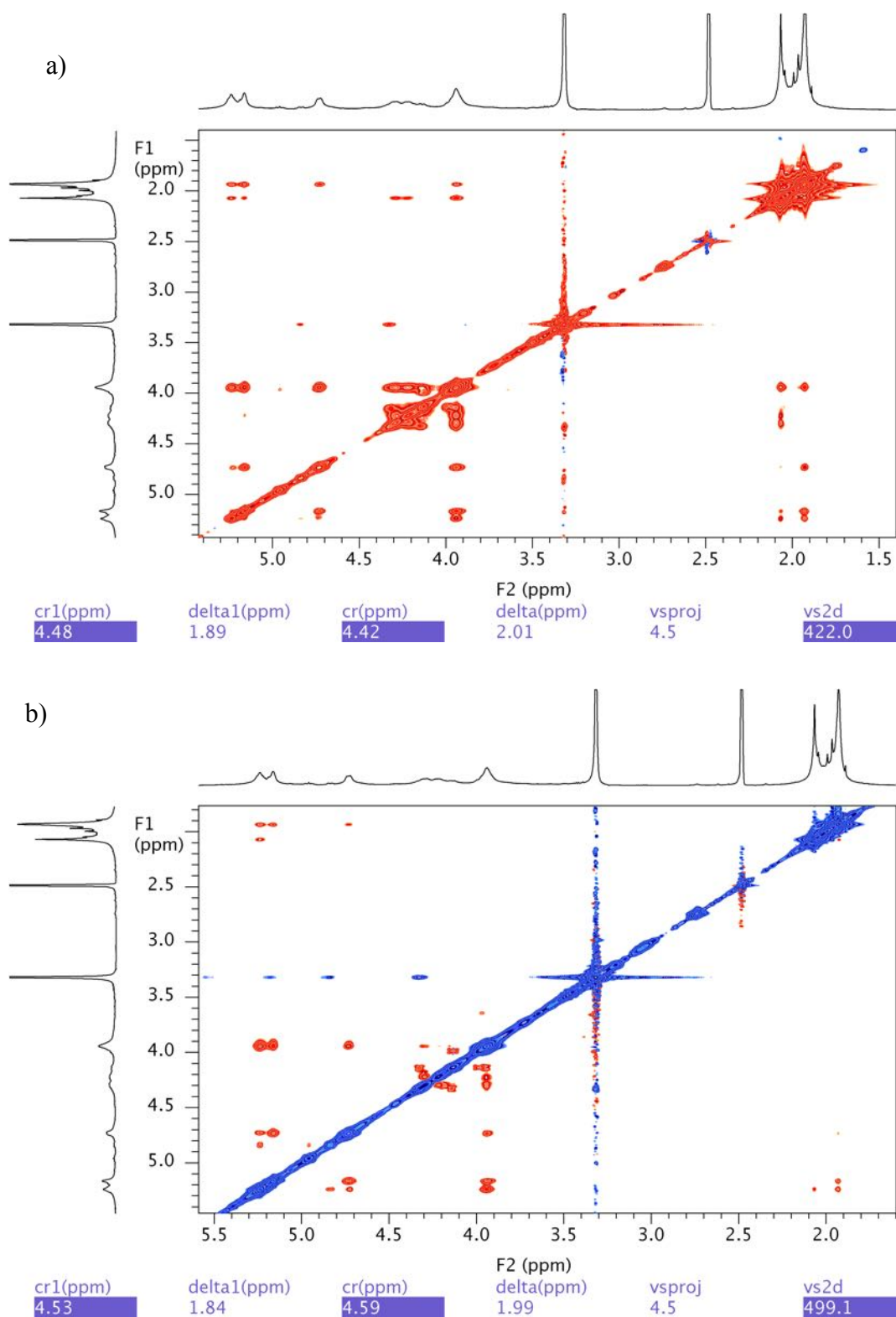
**Figura 2.6** a)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, en DMSO a 70 °C con TFA-*d*1 y b) gCOSY para almidón nativo de mandioca



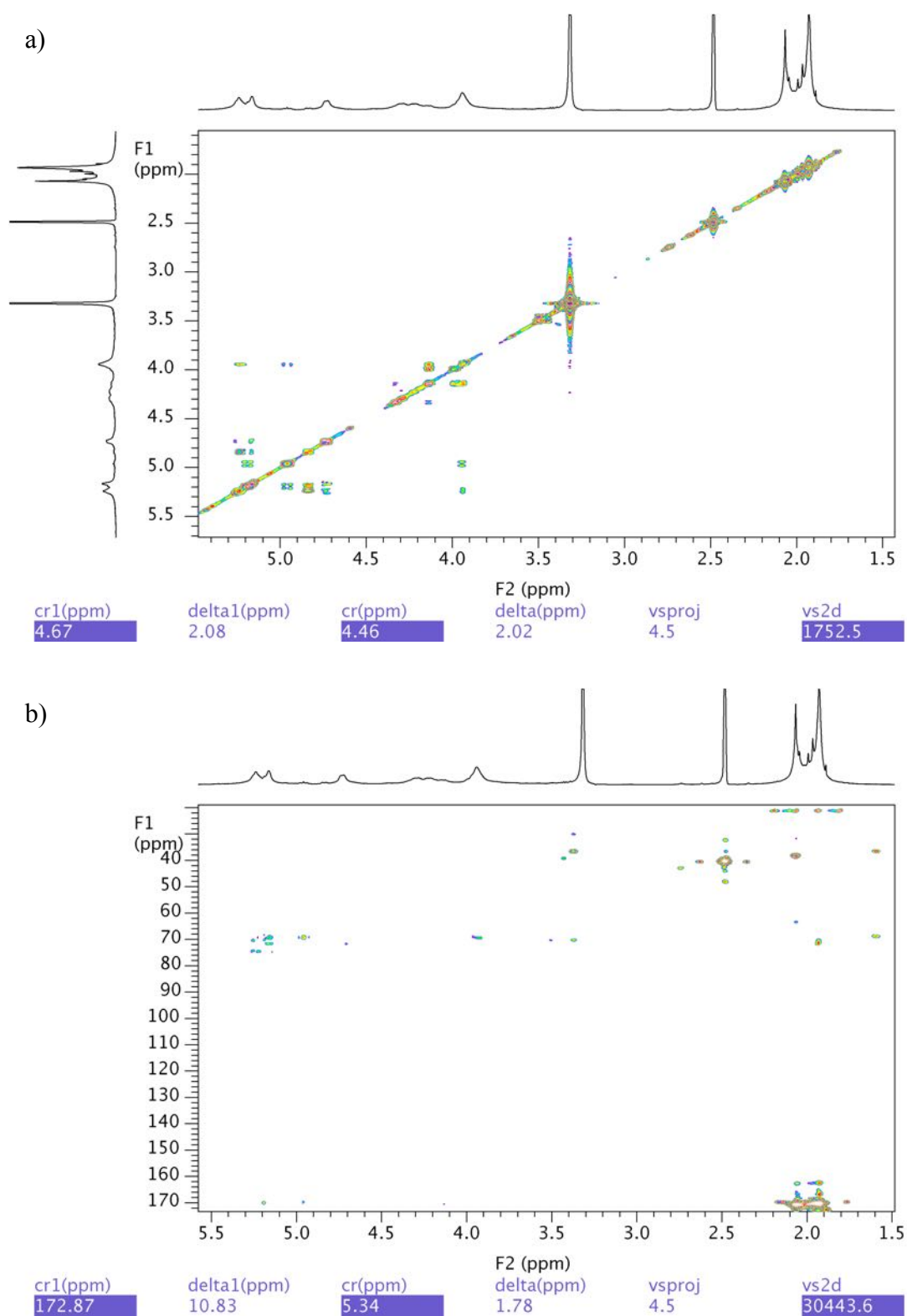
Los espectros bidimensionales para el almidón con máxima sustitución (CSA120) se detallan en las Figuras 2.7, 2.8 y 2.9. Algunos de los experimentos se llevaron a cabo a 70 °C y otros a 25 °C. Ambas temperaturas dan correlaciones similares, pero la caracterización se llevo a cabo preferentemente en los ensayos de HSQC y HMBC a 70 °C, para garantizar la correcta solubilidad de las muestras. La correlación entre un eje y el otro se detalla como un par de puntos con coordenadas en ppm para un espectro (carbono) y otro (protón). Un ejemplo de correlación dada, se dió para el par correspondiente al pico en 90-95 ppm del espectro de carbono (eje de ordenada), y el pico a 5,13 (eje de absisa) del espectro de protón. El protón a 5,13 ppm es el anomérico (H1), por consiguiente el carbono a 90-95 ppm será el C1 del anillo de anhidroglucosa. La significancia estructural de los espectros de RMN fueron descritos en el capítulo 1, mientras que las asignaciones estructurales fueron detalladas en las Tablas 2.2 y 2.3. Los espectros bidimensionales pueden encontrarse para las muestras de CSA30 y CSA 90 en la sección de información complementaria.



**Figura 2.7. a)**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, en  $\text{DMSO-}d_6$  a 500 MHz y 70 °C de CSA120



**Figura 2.8** a)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  zTOCSY, en DMSO a 500 MHz y 70 °C de CSA120 b) ROESY en DMSO para 500 MHz a 25 °C para CSA120



**Figura 2.9** a) gCOSY, en DMSO a 500 MHz y 25 °C de CSA120 b)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120

### **Determinación del grado de ramificación de almidón nativo de Mandioca**

El grado de ramificación calculado para el almidón nativo de mandioca (CS) utilizada en este trabajo es  $DB = 4,76 \pm 0,02 \%$  y para el número promedio de unidades de glucosa  $CLn = 21,01$ . Estos resultados indican que el almidón de mandioca es altamente ramificado. Los valores obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los reportados por Nilsson et al., (1996), para amilopectina de maíz y papa ( $DB = 4,07$ ;  $4,77$  y  $CLn = 24,6$ ;  $21,0$ ), pero no se encontraron valores para el almidón de mandioca en la bibliografía.

Por otro lado, la proporción de enlaces  $\alpha$ -1,4 a  $\alpha$ -1,6 calculada a partir de  $^1H$ -RMN para el caso del almidón nativo estudiado fue de  $20,01$ . Dunn & Krueger, (1999) concluyen que para el almidón de tapioca el valor de esta relación es  $23,4$ . Gidley, (1985) reportó para amilopectina de mandioca un valor de  $17,5$ .

Los valores de  $\%$  DB y proporción  $\alpha$ -1,4 /  $\alpha$ -1,6 generalmente observados para almidones dependen de la fuente botánica, la variabilidad genética y la relación amilosa / amilopectina.

### **Determinación del Porcentaje de Amilosa por $^1H$ -RMN del almidón nativo**

Las relaciones de ramificación se pueden determinar de manera precisa y reproducible para una variedad de almidones y las relaciones  $\alpha$  (1,4) /  $\alpha$  (1,6) se pueden usar para determinar las fracciones de amilosa / amilopectina. Los resultados son comparables a los números obtenidos por la determinación con yodo, aunque casi siempre, los resultados calculados a partir de la integración de RMN resultan mas bajos. Esto, podría deberse a que en el método colorimétrico pudiera existir una sobreestimación dada por la unión del yodo a moléculas de amilopectina, esta hipótesis fué propuesta por Dunn & Krueger (1999).

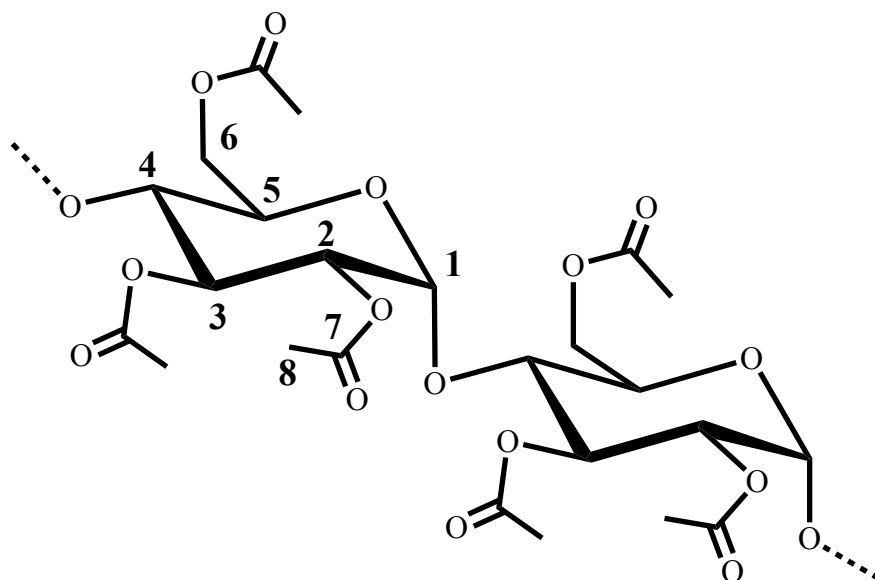
Los mismos autores sostienen que, almidones de guisante, arroz, tapioca y maíz ceroso parecen pertenecer al grupo de almidones que contienen amilopectina con un alto nivel de ramificación, que tienen una relación  $\alpha$  (1,4) /  $\alpha$  (1,6) de aproximadamente  $19$ , a diferencia de los almidones de papa y maíz, cuyos valores son cercanos a  $21$ .

En este trabajo, el porcentaje de amilosa calculado según el espectro de protón, es de  $17,51 \%$ , este valor se encuentra dentro de los mencionados en la bibliografía, donde los valores para almidón de mandioca se encuentran entre  $10$  y  $44\%$ . El consenso plantea que además de la variación según el método empleado, las diferencias podrían estar

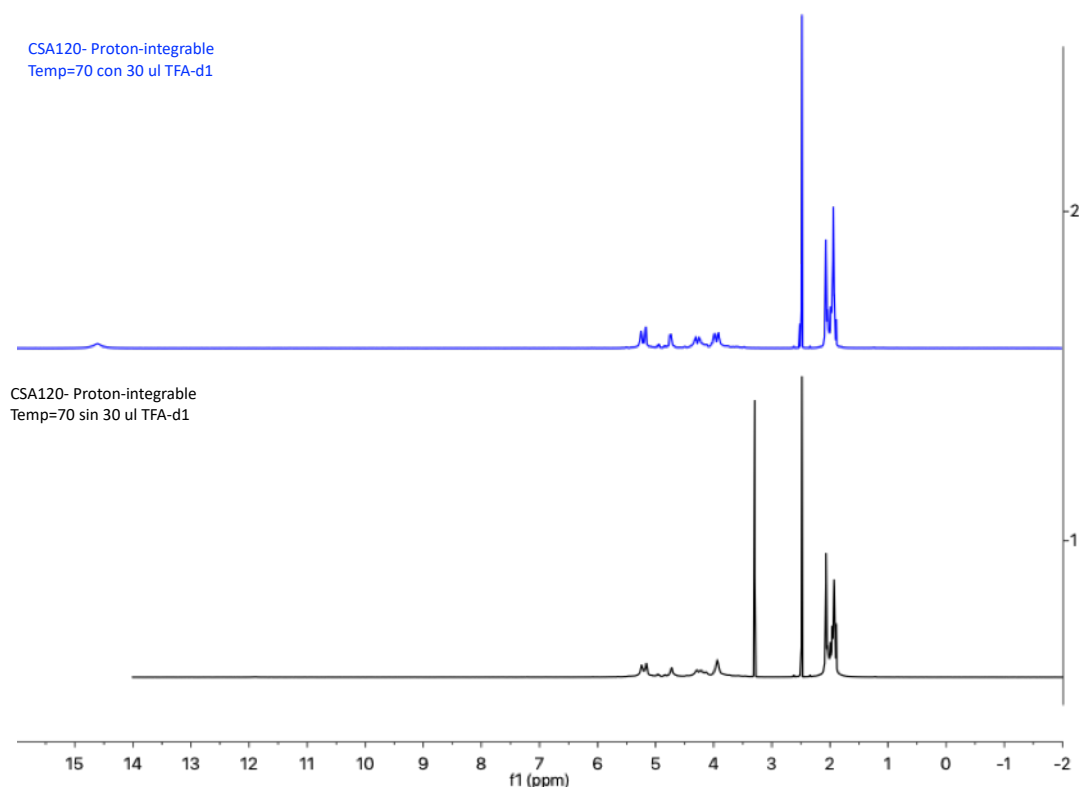
relacionadas con las variedades de mandioca empleadas y las condiciones de crecimiento del cultivo, entre otros (Mali et al., 2002).

### **<sup>1</sup>H-RMN de acetato de almidón de mandioca**

En la Figura 2.10 se muestra la estructura química del acetato de almidón de mandioca. Al agregar TFA-*d*<sub>1</sub> a los almidones acetilados disueltos en DMSO-*d*<sub>6</sub>, fue posible reducir la ampliación de algunas señales asignadas a los OH intercambiables del almidón y cambiar la señal de agua residual (3.06 ppm) a regiones de campo bajo (10-14 ppm), pero no se logró la simplificación del espectro reportado por Tizzotti et al., (2011). Esto último, puede observarse claramente en la Figura 2.11.



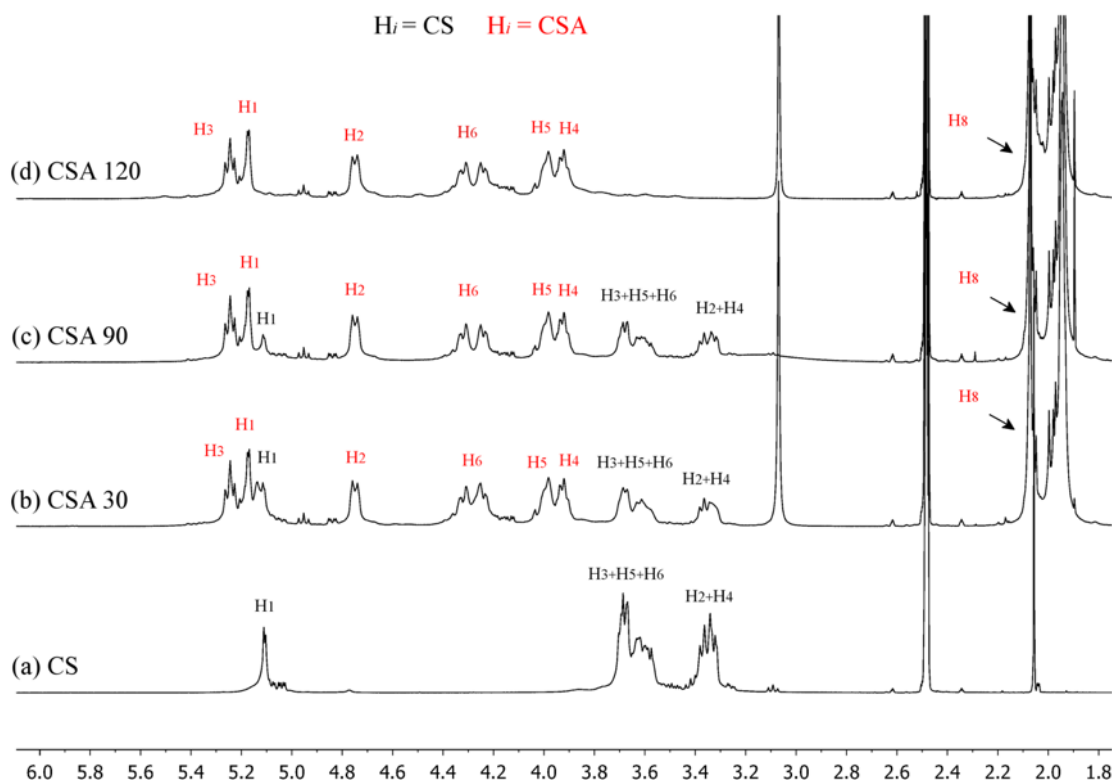
**Figura 2.10** Estructura del acetato de almidón de Mandioca



**Figura 2.11**  $^1\text{H}$ -RMN, en DMSO a 70 °C CSA120 con TFA- $d_1$  y CSA120 sin TFA- $d_1$

Esto, podría atribuirse al hecho de que los grados de sustitución medidos en el presente trabajo son altos (cerca del máximo) y en estudios anteriores se evaluaron almidones acetilados de bajo DS.

En la Figura 2.12, se comparan los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN a 70 °C en DMSO- $d_6$  con la adición de TFA- $d_1$  para el almidón nativo y los almidones acetilados sin TFA- $d_1$ . Como se puede observar, los espectros de las muestras CSA30 y CSA90 resultan una combinación de los espectros de CS y CSA120 completamente acetilado.



**Fig 2.12.**  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de (a) almidón nativo (con  $\text{TFA-}d_1$ ); (b) CSA30; (c) CSA90 y (d) CSA120 (b, c y d sin  $\text{TFA-}d_1$ )

La aparición de las señales correspondientes a los protones de metilo del grupo acetilo en el almidón H8 se observó a 1,9-2,1 ppm. Dado que cada pico es una entidad independiente,  $^1\text{H}$ -RMN podría usarse para el cálculo del DS mediante la integración de picos como lo describen De Graaf, Lammers, Janssen, & Beenackers, (1995) y Tizzotti et al., (2011), pero no se logró la separación completa de señales (esperada después de la adición de  $\text{TFA-}d_1$ ), entonces no fue posible utilizar estos experimentos para el cálculo de DS.

### Determinación del grado de sustitución mediante $^1\text{H}$ -RMN de almidones acetilados

Debido a que no fue posible la simplificación de señales mediante el agregado de  $\text{TFA-}d_1$ , y los picos que corresponden a los protones anoméricos en los espectros de los acetilados de almidón (para todos los DS estudiados en este trabajo), se ven solapados por las señales de otros protones de la unidad de anhidroglucosa; no fue posible lograr una correcta integración para realizar el calculo del DS.

Se podría recurrir a la deconvolución de las señales en el espectro, mediante un software informático, pero nuevamente se estaría incurriendo en un error de estimación de las áreas de los picos.

### $^{13}\text{C}$ -RMN y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN

#### Almidón de mandioca

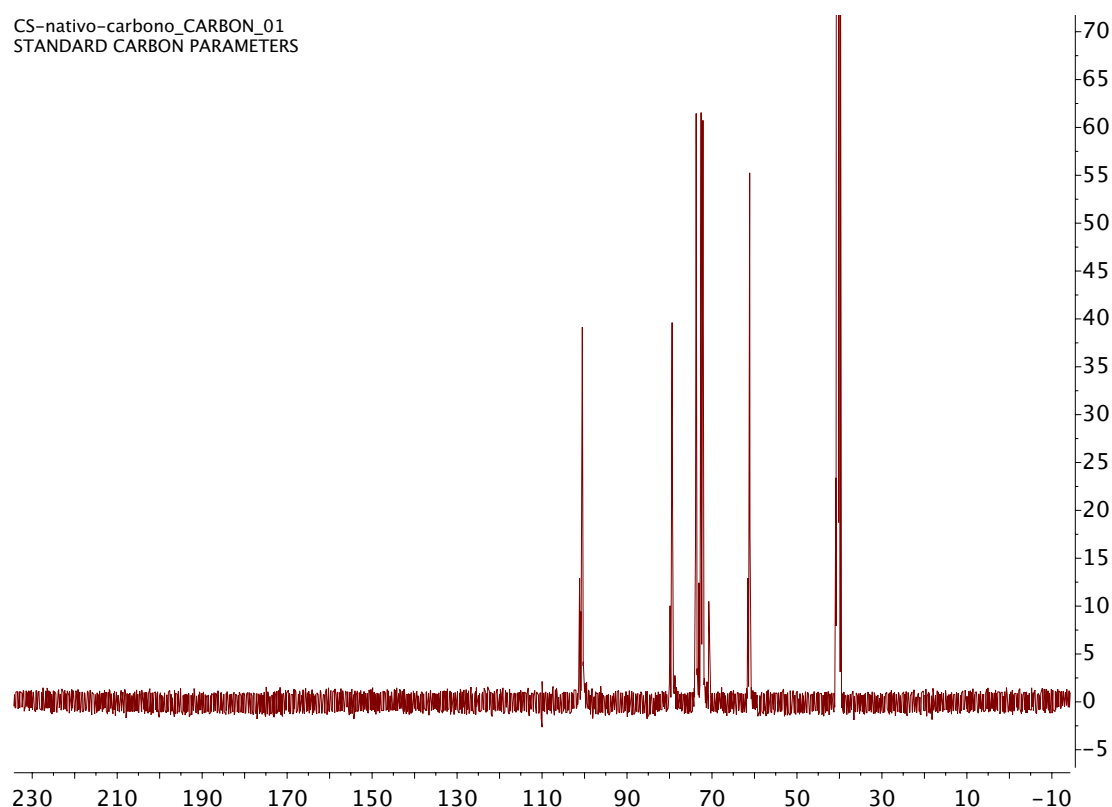
En la Tabla 2.2 se puede observar la asignación de señales para cada núcleo de carbono y la figura 2.13 muestra los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de almidón de mandioca nativo.

**Tabla 2.2** Asignación de señales respectivas a cada núcleo de carbono para almidón de mandioca.

<i>Asignaciones de señales de Carbono</i>	<i>Rango de desplazamiento químico (ppm) Almidón de mandioca (CS)</i>
C <sub>1</sub>	100,50-99,30
C <sub>2</sub>	72,40-71,66
C <sub>3</sub>	73,22-72,80
C <sub>4</sub>	79,32-78,33
C <sub>5</sub>	71,68-71,09
C <sub>6</sub>	60,9-60,06



CS-nativo-carbono CARBON\_01  
STANDARD CARBON PARAMETERS



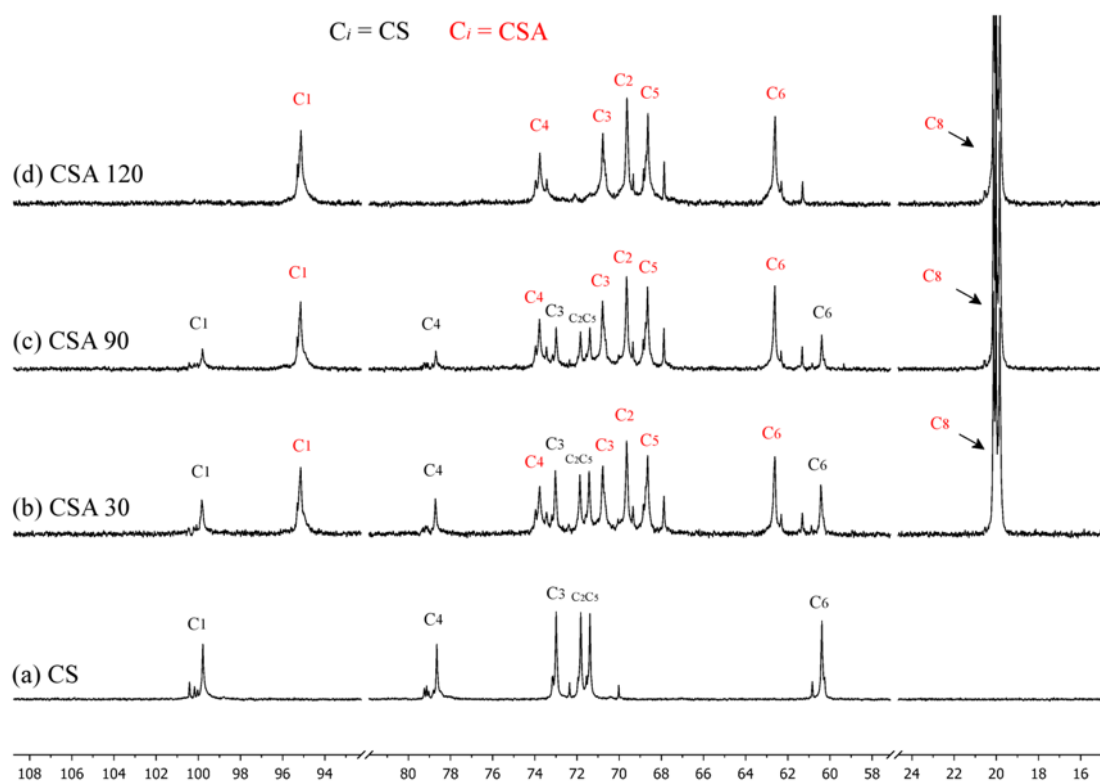
**Figura 2.13**  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de almidón nativo

#### Acetato de almidón de mandioca

En la Tabla 2.3 se puede observar las asignaciones realizadas para los núcleos de carbono para la muestra CSA120 que resulta en una acetilación completa de la unidad de anhidroglucosa. La Figura 2.14 muestra los espectros cuantitativos  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de acetato de almidón de mandioca de diferentes DS, a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  y ofrece una comparación con el espectro convencional de  $^{13}\text{C}$  para almidón nativo.

**Tabla 2.3.** Asignación de señales respectivas a cada núcleo de carbono para CSA120.

<i>Asignaciones de señales de</i>	<i>Rango de desplazamiento</i>
<i>Carbono</i>	<i>químico (ppm)</i>
	<i>CSA120</i>
C <sub>1</sub>	95,61-94,43
C <sub>2</sub>	70,03-69,27
C <sub>3</sub>	71,28-70,43
C <sub>4</sub>	74,03-73,33
C <sub>5</sub>	68,82-68,32
C <sub>6</sub>	63,29-62,12
C <sub>7</sub>	170,00-168,46
C <sub>8</sub>	20,23-19,70



**Figura 2.14**  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  of (a) CS; (b) CSA30; (c) CSA90 and (d) CSA120

### Determinación del grado de sustitución mediante $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN cuantitativo de almidones acetilados

Una ventaja ofrecida por  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN, en contraste con los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN que sufren una extrema superposición de señales, es que el primero tiene un gran rango de desplazamiento químico y como resultado, se pueden identificar diferentes resonancias de carbono dentro del esqueleto (unidades de glucosa), permitiendo la integración de los espectros de carbono. Este hecho, a través de la medición cuantitativa de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN permitió el cálculo de DS para almidones acetilados.

Los diferentes DS calculados con la ecuación 2.7 para los diferentes acetatos de almidón sintetizados se presentan en la Tabla 2.4. Estos valores fueron consistentes con las determinaciones hechas usando el método de titulación que se informaron anteriormente (Tabla 2.1).

Con respecto a las posiciones más frecuentes de acetilación, se encontró que C6 fue más reactivo y más fácil de acetilar que los secundarios (C2 y C3), y la posición más reactiva entre las secundarias fue la correspondiente a C2, repitiéndose este resultado en todas las muestras de CSA estudiadas en este trabajo.

**Tabla 2.4** DS y posiciones de acetilación relativas calculadas a partir de espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR.

<i>Muestra</i>	<i>DS</i>	<i>Desviación Estándar</i>	$X_6$	$X_3$	$X_2$
CSA30	1.97	0.020	0.70 <sup>a</sup>	0.61 <sup>b</sup>	0.66 <sup>c</sup>
CSA90	2.27	0.005	0.80 <sup>a</sup>	0.71 <sup>b</sup>	0.76 <sup>c</sup>
CSA120	2.88	0.015	1 <sup>a</sup>	0.88 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>

Los valores son promedios de análisis por triplicado

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores con nivel de confianza del 95%

Este patrón de sustitución coincide con el estudio de Fedorova & Rogovin (1963) y Xu et al. (2004), quienes atribuyeron este comportamiento al impedimento estérico de las posiciones C2 y C3, ya que se encuentran en la superficie interna del almidón, a diferencia del C6 primario. Por otro lado, el C2 que está más cerca del hemiacetal es más ácido y, por lo tanto, más reactivo que el C3.

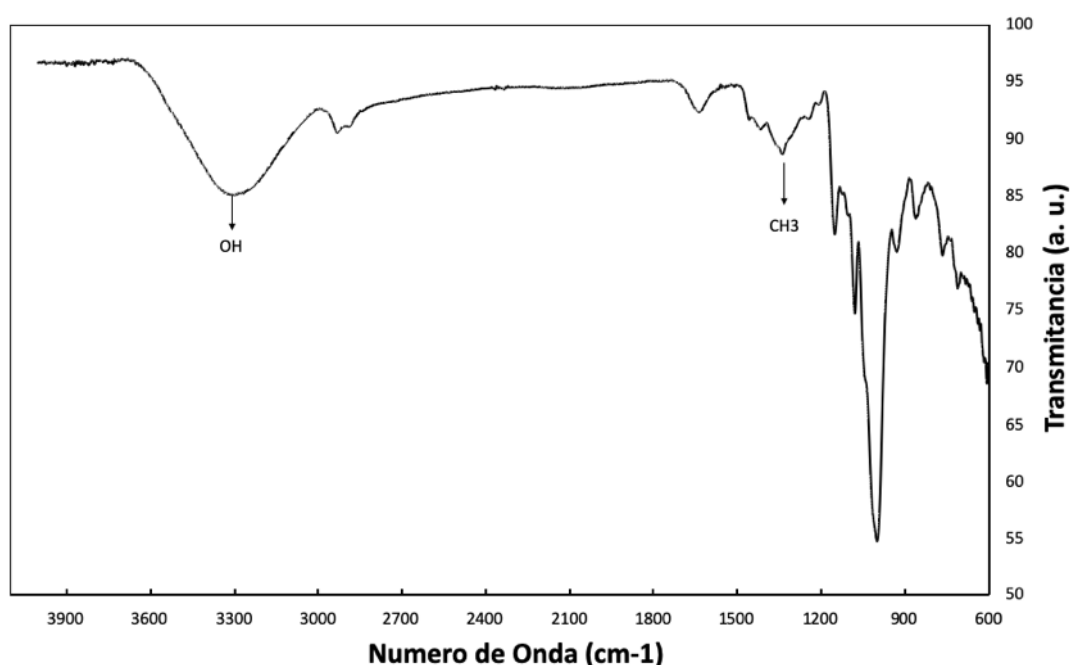
Sin embargo, esto difiere sustancialmente de los resultados obtenidos por Heins, Kulicke, Käufer & Thielking (1998), quienes informaron que la posición favorecida es la de C3. El autor de este trabajo considera que la apreciación de Heins fue producto del método utilizado, que se basa en el cálculo de la sustitución C3 que comprende la

diferencia entre el valor del DS total con las otras posiciones (C2 y C6) y no como un cálculo directo del área de los picos asignados a C3.

## Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

### Almidón de mandioca

Para el almidón de mandioca nativo (Figura 2.15), se observaron varios picos característicos a  $1009\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$  y  $1154\text{ cm}^{-1}$ , atribuidos al estiramiento del enlace C-O. En  $2960\text{ cm}^{-1}$  se observó un pico atribuido al estiramiento de la vibración del C-H y una banda ancha entre  $3300\text{ cm}^{-1}$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo OH. Fue posible discernir un pico a  $1638\text{ cm}^{-1}$  atribuible al agua ligada (Diop, Li, Xie & Shi, 2011; Xu et al., 2004).



**Figura 2.15** ATR/FTIR de almidón nativo de Mandioca

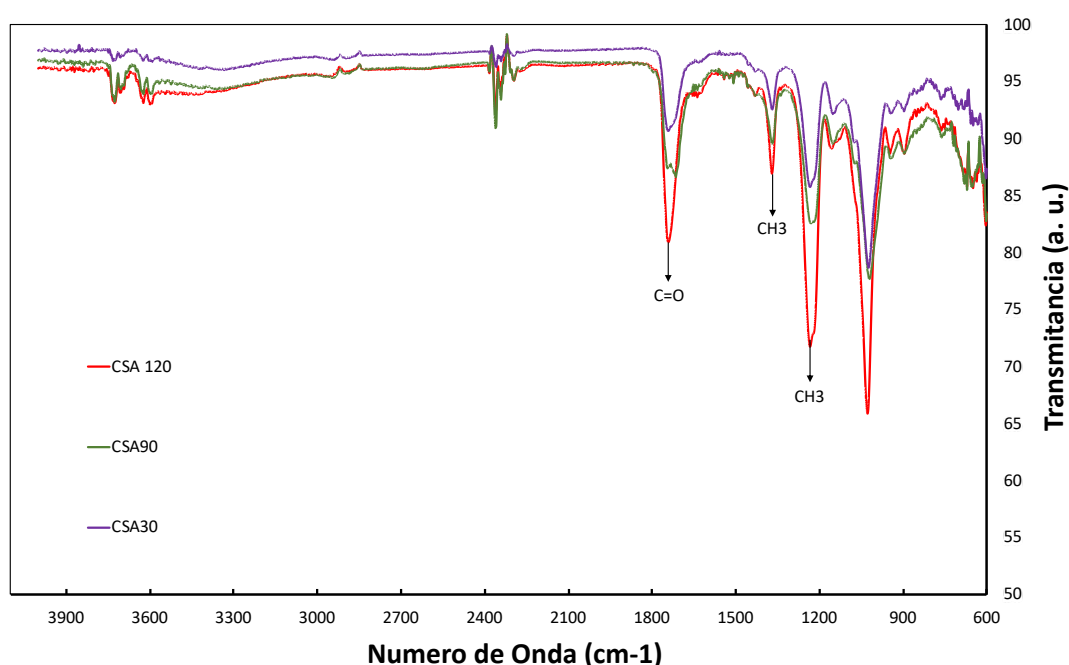
### Acetatos de almidón de mandioca

En los espectros correspondientes al almidón acetilado (Figura 2.16), se observaron nuevos picos de absorción. A  $1749\text{ cm}^{-1}$  se observó el pico característico de  $\text{C}=\text{O}$  (Bello-Pérez, Agama-Acevedo, Zamudio-Flores, Mendez-Montealvo, & Rodriguez-Ambriz, 2010; Diop et al., 2011; Xu et al., 2004). A  $1375\text{ cm}^{-1}$ , se observó un pico atribuido a la vibración del metilo simétrico y en  $1239\text{ cm}^{-1}$  al estiramiento del enlace

CO. La aparición de estos nuevos picos de absorción confirmó la formación del almidón acetilado, producto de la reacción de esterificación.

Por otro lado, la intensidad de los picos aumentó proporcionalmente al aumento del grado de acetilación entre  $DS = 1,9$  y  $DS = 2,9$ . También se pudo observar una notable disminución de los picos a  $1009\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$  y  $1154\text{ cm}^{-1}$ , característica de la vibración C-O del almidón nativo, ya que los grupos hidroxilo fueron reemplazados por el éster.

El banda ancha alrededor de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , particularmente asociado con los grupos OH, desapareció por completo para los almidones acetilados en el rango de DS estudiado, a diferencia de lo informado por Diop et al., (2011), quien encuentra una disminución gradual de esta banda hasta  $DS = 2,93$  para almidones de maíz acetilados.



**Figura 2.16** ATR/FTIR de acetilados de almidón de Mandioca de diferentes grado de sustitución

### Propiedades térmicas de almidón nativo: análisis termogravimétrico

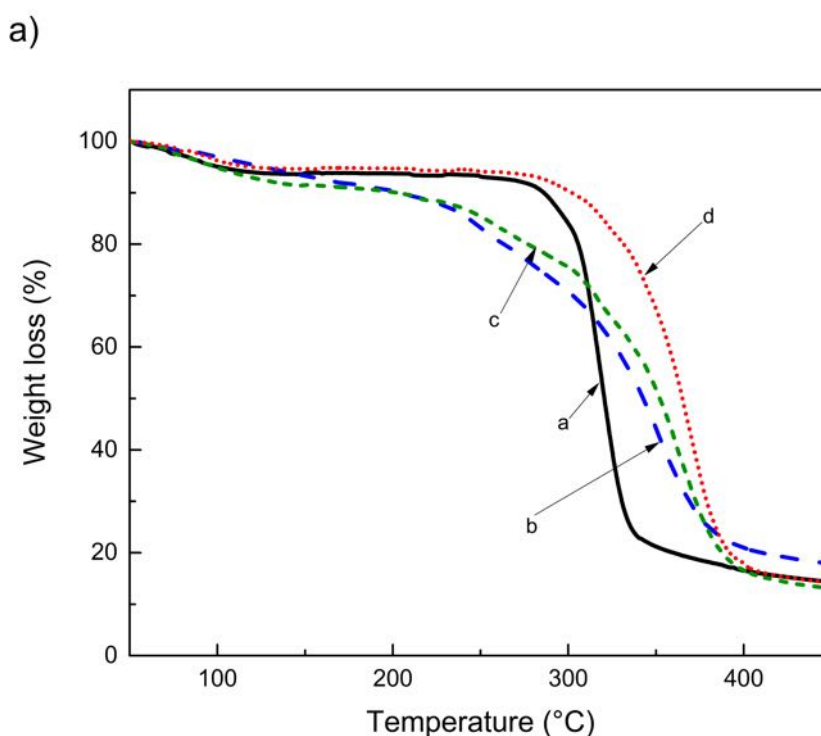
#### Almidón de mandioca

En el análisis termogravimétrico, el almidón nativo mostró una pérdida de peso en dos etapas, por debajo de  $500\text{ °C}$ . La primera, corresponde a la pérdida de agua y / o componentes volátiles alrededor de  $60\text{-}100\text{ °C}$  y la segunda, a la descomposición del

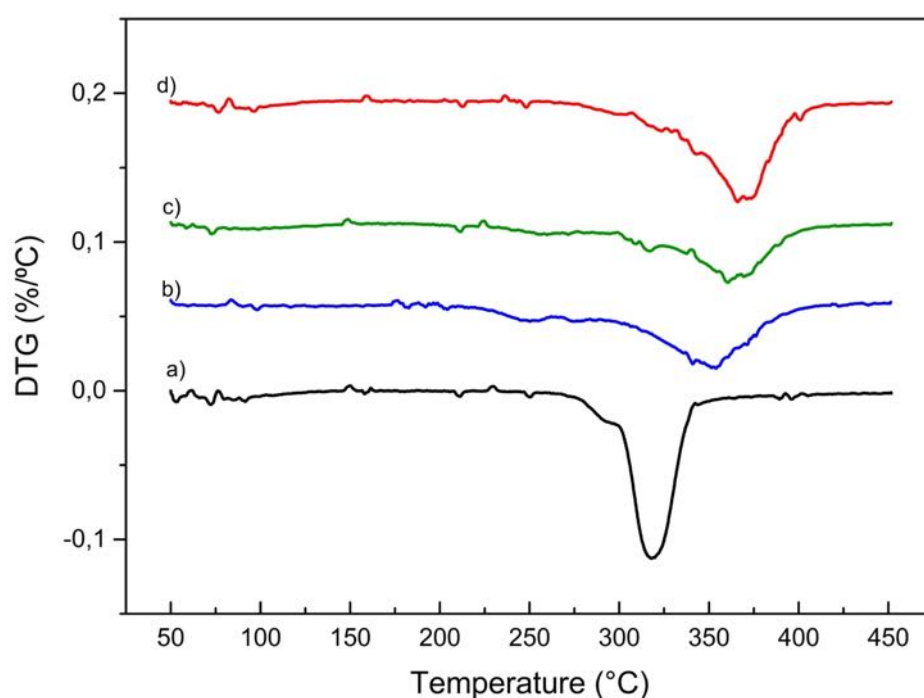
almidón (Figura 2.17.a). Según el análisis de DTA, esta descomposición (la más alta) ocurrió en el rango de 272-340 °C (Figura 2.18.a)

### Acetato de almidón de mandioca

Las muestras cuyos DS son 1,9 y 2,4 (Figura 2.17 b y c ) también mostraron posterior a la pérdida de agua y compuestos volátiles, una pérdida de peso en dos etapas, la primera pérdida de peso que ocurre entre 230 y 280 °C se atribuye a la descomposición del almidón, seguida de una descomposición del almidón acetilado en el rango de 300-391 °C. La temperatura más baja a la que comienza la descomposición del almidón con DS intermedio puede atribuirse a los cambios estructurales que experimenta el grano de almidón durante la reacción de acetilación. La muestra con DS 2,9 (Figura 2.17 d) mostró una descomposición única entre 330-420 °C con una caída abrupta, comportamiento similar al de un homopolímero. El aumento de la estabilidad térmica en esta muestra puede atribuirse a la baja cantidad de hidroxilos que quedan en la molécula de almidón después de la acetilación. Estos resultados son similares a los obtenidos para el almidón de jengibre amarillo (Zhang et al., 2009).



**Figura 2.17** Curvas de TGA de a) CS b) CSA30, c) CSA90, d) CSA120

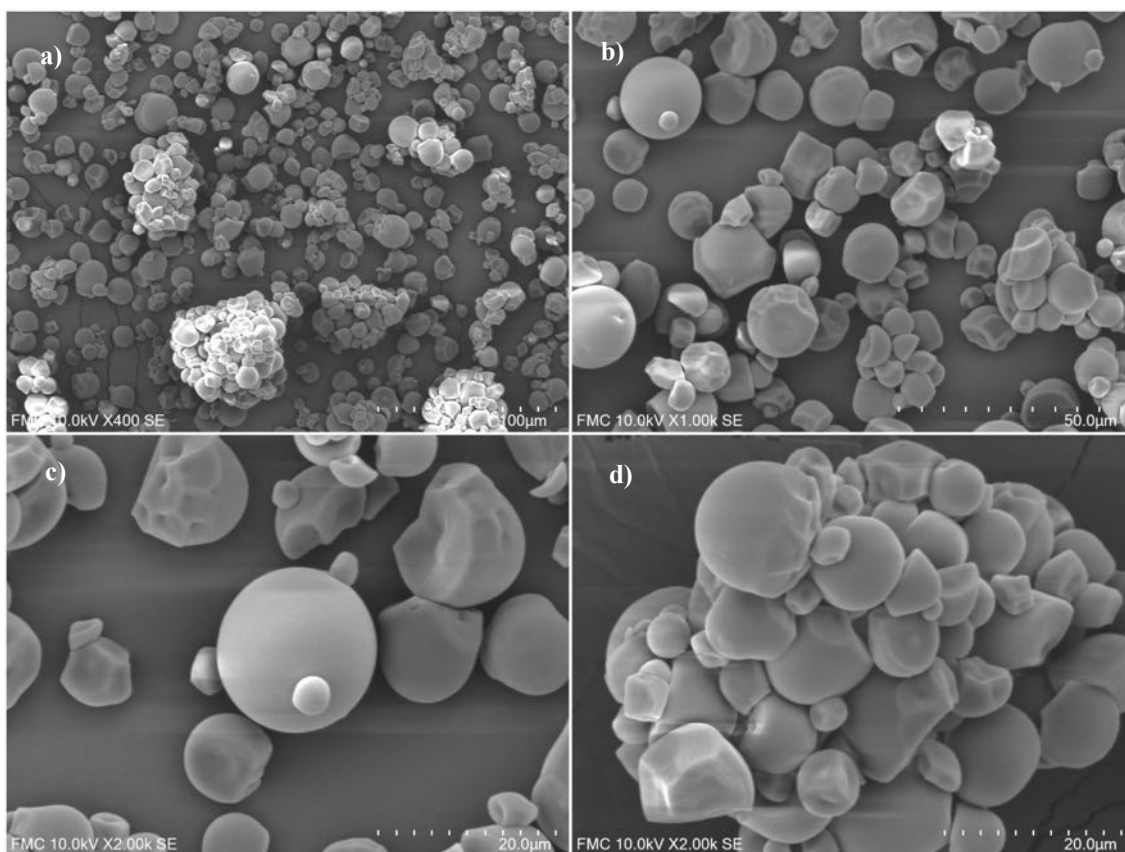


**Figura 2.18** Curvas de DTG de: a) CS, b) CSA30, c) CSA90, d) CSA120

### **Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

#### **Almidón de mandioca**

La Figura 2.19 muestra las micrografías del almidón de mandioca nativo. Las micrografías SEM del almidón nativo muestran granos de tipo esférico, con superficies lisas, muchos de ellos truncados, que tienden a formar grupos o racimos. Los tamaños varían entre 5 y 15 micras. Mbougoung et al. (2012) describieron una apreciación similar para el almidón de mandioca.

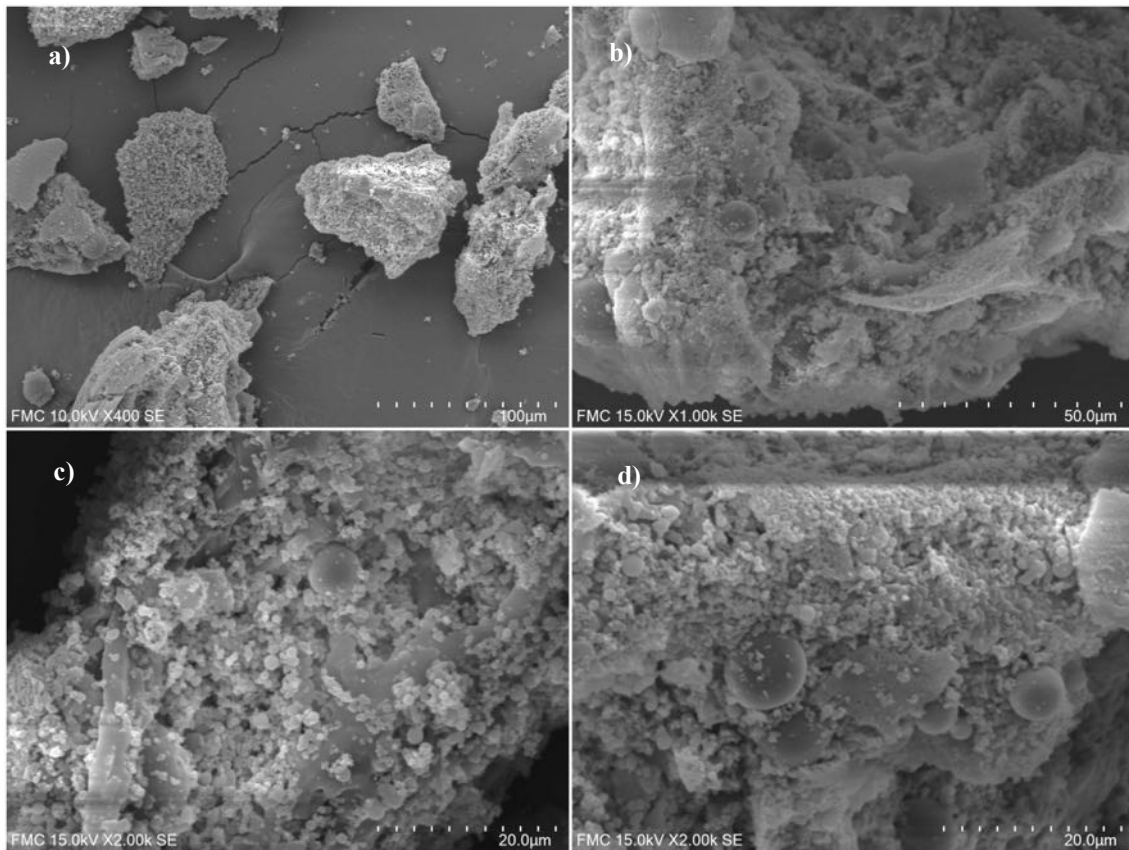


**Figura 2.19.** Micrografías electrónicas de barrido de Almidón de Mandioca (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)

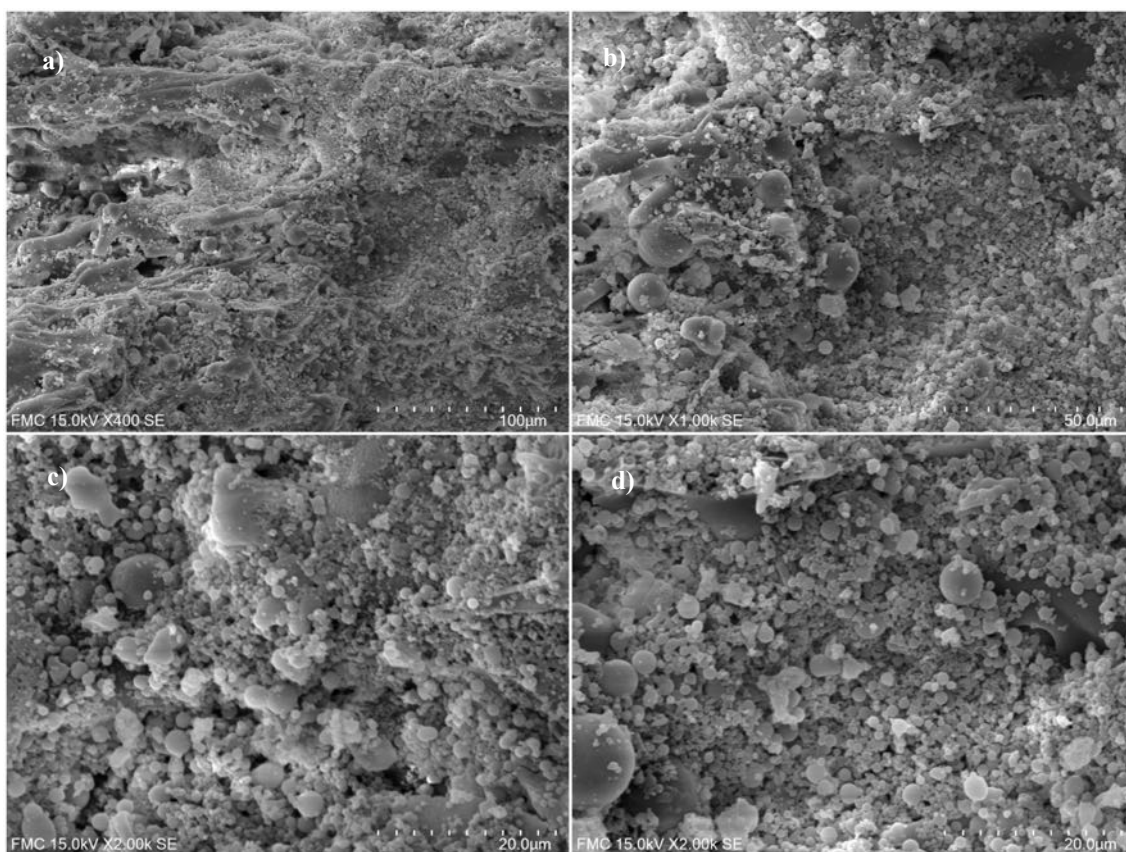
#### **Acetato de almidón de mandioca**

La reacción de acetilación generó la pérdida progresiva de la estructura del grano, como se puede ver en las micrografías de CSA30 y CSA90 (Figuras 2.20 y 2.21). Durante el mismo, los granos se fragmentaron y fundieron para formar nuevas estructuras (fusión) y este proceso se hizo más evidente a medida que aumentó el grado de sustitución. Esta fusión sería en gran parte consecuencia de la introducción de grupos acetilos voluminosos, que rompen la estructura interna y debilitan el gránulo, mientras que los fusionan (Diop et al., 2011).

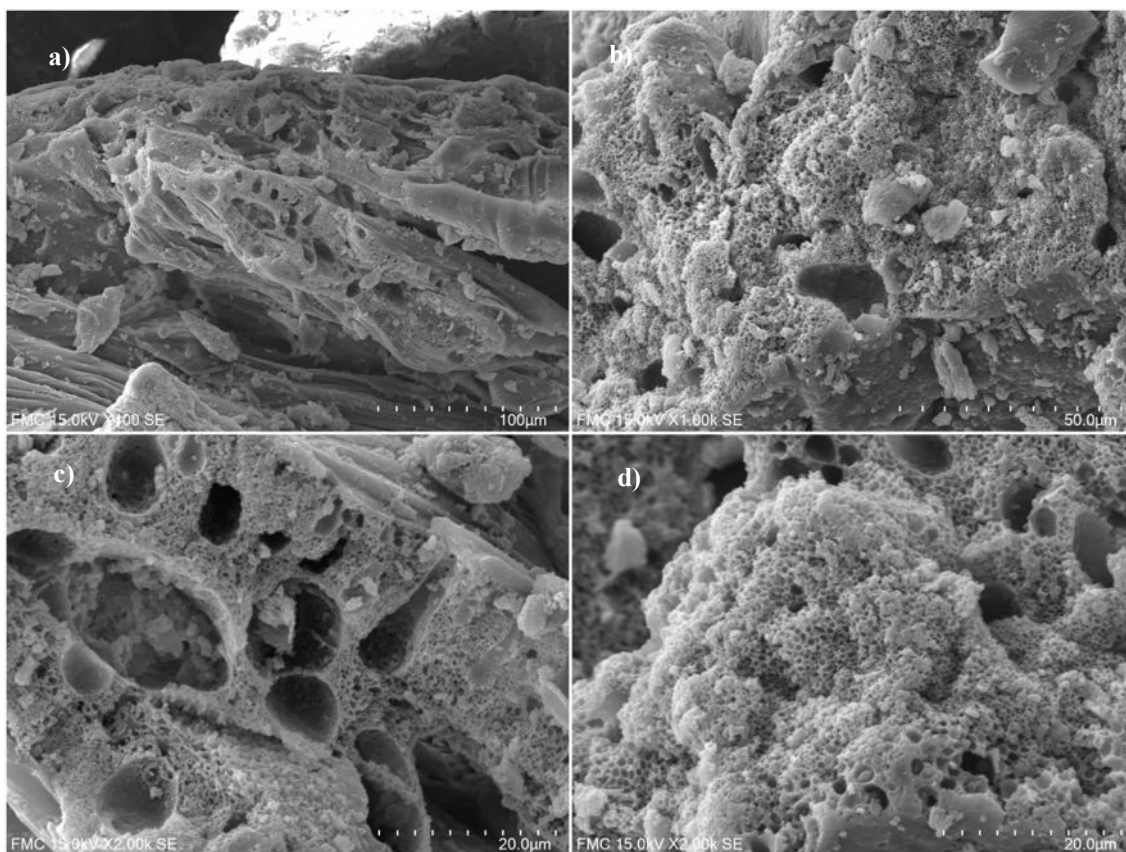




**Figura 2.20** Micrografías electrónicas de barrido de acetato de Almidón de Mandioca CSA30 (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)



**Figura 2.21** Micrografías electrónicas de barrido de acetato de Almidón de Mandioca CSA90 (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)



**Figura 2.22** Micrografías electrónicas de barrido de acetato de Almidón de Mandioca CSA120 (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)

En la muestra de CSA120 (Figura 2.22) que está totalmente acetilada, se puede ver la fusión total de los granos de almidón y la apariencia de la estructura en forma de colmena informada por Xu et al., (2004). Sin embargo, no se observó la estructura del tipo fibroso, esto último podría atribuirse a las diferencias en el origen botánico del almidón estudiado.

Debido a que las concentraciones de anhídrido acético y ácido acético fueron constantes, las diferencias en las transformaciones generadas en los almidones acetilados deben atribuirse al tiempo de reacción y al calentamiento al que fueron sometidos los almidones respectivos durante el proceso de esterificación.

## CONCLUSIONES

---

Se sintetizó acetato de almidón de mandioca de alto grado a partir de almidón nativo. Resultando a partir de la reacción de esterificación, un material polimérico más termoestable y produciéndose un cambio radical en la morfología del gránulo de almidón.

Los espectros FTIR de almidones acetilados confirmaron la formación del éster altamente sustituido.

Es importante tener en cuenta que en este trabajo, a diferencia de otros, las asignaciones de señales en los espectros de RMN de los materiales preparados se verificaron con las asignaciones de espectros de correlación independientes (RMN 2D). En este capítulo, se demostró que la espectroscopía de RMN podría usarse como una herramienta rápida y precisa para el análisis estructural de almidón nativo y acetilado. Esta técnica permitió establecer que el almidón de mandioca es altamente ramificado, dato que no ha sido reportado por la bibliografía hasta el momento y determinar el grado de sustitución de los almidones acetilados, con datos más precisos, que además fueron concordantes con los obtenidos mediante la titulación por retorno. Además, a través de la espectroscopía  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN también fue posible determinar el patrón de sustitución regioselectiva, encontrándose que la posición de acetilación más favorable para el almidón de mandioca es C6, seguido de C2 y C3, una declaración en la que no hay coincidencia en la bibliografía.

## ABREVIATURAS

---

CS: Almidón de mandioca

CSA30: almidón de mandioca acetilado preparado en un tiempo de reacción de 30 minutos.

CSA90: almidón de mandioca acetilado preparado en un tiempo de reacción de 90 minutos.

CSA120: almidón de mandioca acetilado preparado en un tiempo de reacción de 120 minutos.

DS: grado de sustitución

CLn: Longitud promedio de la cadena

DB: Grado de ramificación

DMSO- $d_6$ : Dimetilsulfóxido deuterado

TFA- $d_1$ : Ácido trifluorocético deuterado.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Ayucitra, A. (2013). Preparation and Characterisation of Acetylated Corn Starches. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 3(3), 156–159. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2012.v3.178>
- Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Zamudio-Flores, P. B., Mendez-Montevalvo, G., & Rodriguez-Ambriz, S. L. (2010). Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1434–1440. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.003>
- Chi, H., Xu, K., Wu, X., Chen, Q., Xue, D., Song, C., ... Wang, P. (2008). Effect of acetylation on the properties of corn starch. *Food Chemistry*, 106(3), 923–928. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.002>
- Colussi, R., Pinto, V. Z., El Halal, S. L. M., Vanier, N. L., Villanova, F. A., Marques E Silva, R., ... Dias, A. R. G. (2014). Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.070>
- Dais, P., Peng, Q. J., & Perlin, A. S. (1987). A relationship between  $^{13}\text{C}$ -chemical-shift displacements and counterion-condensation theory, in the binding of calcium ion by heparin. *Carbohydrate Research*. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80023-X](https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80023-X)
- De Graaf, R. A., Lammers, G., Janssen, L. P. B. M., & Beenackers, A. A. C. M. (1995). Quantitative Analysis of Chemically Modified Starches by  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19950471205>
- Diop, C. I. K., Li, H. L., Xie, B. J., & Shi, J. (2011). Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates. *Food Chemistry*, 126(4), 1662–1669. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.050>
- Dunn, L. B., & Krueger, W. J. (1999). Branching ratios of starch via proton nuclear magnetic resonance and their use in determining amylose/amylopectin content: Evidence for three types of amylopectin. *Macromolecular Symposia*. <https://doi.org/10.1002/masy.19991400119>
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Science and*

- Technology. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.024>
- Fedorova, A. F., & Rogovin, Z. A. (1963). A study of the relative reactivity of the hydroxyl groups of cellulose in esterification in an acidic medium. *Polymer Science U.S.S.R.* [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(63\)90350-2](https://doi.org/10.1016/0032-3950(63)90350-2)
- Feuer, B. I. (1998). Patent No. 5710269. USA: US Patent.
- Gidley, M. J. (1985). Quantification of the structural features of starch polysaccharides by n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research*. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)90009-6)
- Heins, D., Kulicke, W. M., Käuper, P., & Thielking, H. (1998). Characterization of acetyl starch by means of NMR spectroscopy and SEC/MALLS in comparison with hydroxyethyl starch. *Starch/Stärke*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-379X\(199810\)50:10<431::AID-STAR431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-379X(199810)50:10<431::AID-STAR431>3.0.CO;2-F)
- Jarowenko, W. (1986). Acetylated starch and miscellaneous organic esters. In *Modified starches: Properties and uses*.
- Khalil, M. I., Hashem, A., & Hebeish, A. (1995). Preparation and Characterization of Starch Acetate. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19950471005>
- Laignel, B., Bliard, C., Massiot, G., & Nuzillard, J. M. (1997). Proton NMR spectroscopy assignment of D-glucose residues in highly acetylated starch. *Carbohydrate Research*, 298(4), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)00314-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00314-X)
- López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041>
- Luo, Z. G., & Shi, Y. C. (2018). Distribution of acetyl groups in acetylated waxy maize starches prepared in aqueous solution with two different alkaline concentrations. *Food Hydrocolloids*, 79, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.015>
- Mark, A. M., & Mehlretter, C. L. (1972). Facile Preparation of Starch Triacetates. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19720240302>
- Mbougung, P. D., Tenin, D., Scher, J., & Tchiégang, C. (2012). Influence of acetylation on physicochemical, functional and thermal properties of potato and cassava starches. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.006>
- Miladinov, V. D., & Hanna, M. A. (2000). Starch esterification by reactive extrusion.

- Industrial Crops and Products. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00033-3)
- Mora-Gutierrez, A., & Baianu, I. C. (1991). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Chemically Modified Waxy Maize Starch, Corn Syrups, and Maltodextrins. Comparisons with Potato Starch and Potato Maltodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf00006a011>
- Nilsson, G. S., Bergquist, K. E., Nilsson, U., & Gorton, L. (1996). Determination of the degree of branching in normal and amylopectin type potato starch with <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy: Improved resolution and two-dimensional spectroscopy. *Starch/Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.19960481003>
- Osundahunsi, O. F., Seidu, K. T., & Mueller, R. (2014). Effect of presence of sulphurdioxide on acetylation and sorption isotherm of acetylated starches from cultivars of cassava. *Food Chemistry*, 151, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.020>
- Seligra, P. G., Medina Jaramillo, C., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.041>
- Shogren, R. L. (2003). Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00305-3)
- Shogren, Randal L. (1996). Preparation, thermal properties, and extrusion of high-amylose starch acetates. *Carbohydrate Polymers*, 29(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00143-3](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00143-3)
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.006>
- Singh, J., Kaur, L., & Singh, N. (2004). Effect of acetylation on some properties of corn and potato starches. *Starch/Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.200400293>
- Sodhi, N. S., & Singh, N. (2005). Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.018>
- Tizzotti, M. J., Sweedman, M. C., Tang, D., Schaefer, C., & Gilbert, R. G. (2011). New <sup>1</sup>H NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade



starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

<https://doi.org/10.1021/jf201209z>

Xu, Y., Miladinov, V., & Hanna, M. A. (2004). This article is from the November-December 2004 issue of published by the American Association of Cereal Chemists, Inc. Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution 1. *Cereal Chemistry*, 81(December), 735–740.

Zhang, L., Xie, W., Zhao, X., Liu, Y., & Gao, W. (2009). Study on the morphology, crystalline structure and thermal properties of yellow ginger starch acetates with different degrees of substitution. *Thermochimica Acta*.

<https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.05.019>

Zhu, F. (2017). NMR spectroscopy of starch systems. *Food Hydrocolloids*, 63, 611–624. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.015>

## **CAPÍTULO 3**

*Desarrollo y caracterización de películas de almidón, amilosa, amilopectina de mandioca y acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución*

---

## INTRODUCCIÓN

---

El almidón es un material que tiene la propiedad de formar soluciones con notable capacidad filmogénica. La más simple obtención de películas de almidón implica la desestructuración de los gránulos de almidón nativo utilizando solo agua como plastificante, pero es bien conocido que, para lograr mejorar las propiedades de los materiales obtenidos, es fundamental el agregado de otros plastificantes además del agua.

La mayoría de los antecedentes científicos en el área de bioplásticos de almidón estudian la obtención y caracterización de películas fabricadas por casteo, empleando soluciones acuosas, y manteniendo las mismas a temperaturas cercanas a la de gelatinización del material (60-85 °C) (Alves, Mali, Beléia, & Grossmann, 2007; Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2005; Mukerjea & Robyt, 2010).

Johnston, Mukerjea, & Robyt, (2011) y Myllärinen Päivi, Partanen Riitta, Seppälä Jukka, & Forssell Pirkko, (2002) utilizaron presiones supratmosféricas y temperaturas entre 120 y 160 °C, para asegurar la completa gelatinización del almidón, mientras que Protzman, T. Wagoner, (1964), encontró que gelatinizando de esta manera evitaba el aumento de la cristalinidad mejorando la flexibilidad y la extensibilidad de los materiales obtenidos.

Existen numerosos estudios en el desarrollo de películas de almidón de diferentes fuentes botánicas y mezclas de almidón con acetato de almidones. La gran mayoría de los trabajos concluyen que, si bien el almidón constituye una alternativa interesante para el reemplazo de los plásticos del petróleo, por su bajo costo y alta disponibilidad, la alta susceptibilidad a la humedad y sus propiedades mecánicas limitadas, condicionan su aplicación.

Con respecto a la mejora de las propiedades mecánicas, varios autores proponen la utilización de amilosa, entendiendo que este último polímero presenta mejores propiedades mecánicas (Myllärinen Päivi et al., 2002; Protzman, T. Wagoner, 1964) y otros autores utilizan almidones de alta amilosa obtenidos genéticamente (Maria Alejandra Bertuzzi, Gottifredi, & Armada, 2012; García, Martino, & Zaritzky, 2000; Slavutsky & Bertuzzi, 2014). La preponderancia de amilosa en los almidones produce películas más fuertes. La estructura ramificada de la amilopectina generalmente conduce a películas más frágiles (Tharanathan, 2003). Por otro lado, el enriquecimiento de films de almidón con amilosa también fue estudiado. Alves et al., (2007),

encontraron que el enriquecimiento de soluciones filmogénicas con soluciones de amilosa origina films mas fuertes y permeables.

Otra alternativa, representa el agregado de plastificantes externos como glicerol, sorbitol, ácido cítrico, triacetin etc. Estos son utilizados con el fin de aumentar la relajación entre las cadenas del polímero, y de esta manera mejorar la ductilidad de las películas obtenidas. Esta alternativa resulta interesante, pero implica una caída en los valores de tensión de rotura, y una disminución (dependiendo de la naturaleza del plastificante) en las propiedades de barrera del film (M. A. Bertuzzi, Armada, & Gottifredi, 2007; D. Lourdin, Coignard, Bizot, & Colonna, 1997). Otros problemas también son reportados por la aplicación de plastificantes, como ser la falta de compatibilidad entre los componentes de las matrices, efectos de pegajosidad a partir de determinadas concentraciones, además de aceleración en los fenómenos de retrogradación, entre otros.

La solubilidad en agua de los films de almidón, también condiciona su utilización, por ello numerosos trabajos en almidones acetilados de alto grado de sustitución fueron estudiados. La hidrofobicidad del acetato de almidón se incrementa a medida que aumenta el grado de sustitución y la longitud de la cadena del sustituyente. Fringant, Rinaudo, Gontard, Guilbert, & Derradji, (1998) informaron que acetato de almidón con un DS mayor que 1,7 presenta propiedades típicamente hidrofóbicas. Una serie de estudios encontraron buena compatibilidad de acetato de almidón con otros materiales, dando como resultado un material con propiedades mecánicas mejoradas (Guan & Hanna, 2004; Jiang, Li, Luo, Zhao, & Hou, 2016; Xu, Miladinov, & Hanna, 2004).

Tarvainen, Sutinen, Peltonen, Tiihonen, & Paronen, (2002), mostraron que el acetato de almidón de papa de grado de sustitución 2.8, permite obtener por casting películas claras y continuas, con alta hidrofobicidad. Maarit Tarvainen et al., (2003), investigaron la capacidad de los n-alquénil anhídridos succínicos (n-ASA) como plastificantes externos, a fin de mejorar las características de formación de película de acetato de almidón de papa de grado de sustitución 2,8, obteniendo buenos resultados.

Por ultimo, la retrogradación de las películas de almidón también condiciona su utilización. Famá et al., (2005) encontraron incrementos en la región cristalina de films de almidón en tiempos relativamente cortos (8 semanas). El efecto del almacenamiento, genera aumento de la cristalinidad con su consecuente impacto en las propiedades mecánicas del film.

En el presente capítulo, se planteó la preparación de películas de almidón, de baja concentración de polímero (por debajo del 4%) recurriendo a la gelatinización a altas temperaturas (120 °C), teniendo como único plastificante agua, a partir de almidón de mandioca. Al mismo tiempo, se realizó la separación de las fracciones del almidón nativo (amilosa y amilopectina) mediante el método propuesto por Mukerjea, y el desarrollo de películas de ambas fracciones. A fines de obtener películas de alta hidrofobicidad, se desarrollaron películas de acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución, utilizando un plastificante de naturaleza apolar. Una completa caracterización de las películas desarrolladas fue llevada a cabo, poniendo el foco en el efecto del almacenamiento por tiempos prolongados en las propiedades mas relevantes de los films, a fines de establecer cuales de ellos podrían ser aplicados como recubrimientos a la industria alimentaria regional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Materiales

Almidón de mandioca comercial fue proporcionado por Aldema®, Acetato de almidón de mandioca DS=2,9 fue sintetizado según procedimientos explicados en el capítulo 2, el agua ultra pura fue provista a partir de un equipo de intercambio iónico (Milli-Q, Millipore). Metanol, n-butanol fueron de calidad analítica comprados a Cicarelli® Reagent SA. Cloroformo, fueron proporcionado por Merck®, (2-dodecen-1-il) anhídrido succínico (DSA) fue proporcionado por Sigma Aldrich® y moldes de TEFLON® fueron adquiridos comercialmente.

### Obtención de películas de almidón nativo de mandioca

El método de obtención de películas constó de tres etapas: *homogeneización de los componentes e hidratación del almidón, gelatinización de la suspensión acuosa, y casting y secado de films.*

*Etapas de homogeneización de los componentes e hidratación del almidón:* en esta primera parte se homogeneizaron 26,25 g de almidón de mandioca comercial con 1000

mL de agua destilada en un agitador magnético con agitación controlada (500 rpm) por 20 min a temperatura ambiente de 25 °C.

*Etapas de gelatinización de la suspensión acuosa:* para la gelatinización del almidón, se procedió al calentamiento a alta presión de la suspensión acuosa obtenida luego de la *etapa de la homogeneización e hidratación del almidón*. Para ello, se dispuso de un autoclave conectado a un controlador de presión y temperatura. La temperatura de gelatinización se fijó a 120 °C por 1 h. Una vez finalizado el proceso de gelatinización, se obtuvo el gel deseado.

*Etapas de casting y secado de films:* una vez finalizado el proceso de gelatinización, las soluciones filmogénicas se dejaron enfriar hasta 90 °C y se diluyeron 1/4 con agua destilada a la misma temperatura. Una vez que la solución se enfrió a 80 °C, se colocaron 100 mL en moldes circulares de TEFLON® de 19 cm de diámetro.

Las películas fueron secadas a temperatura y humedad ambiente durante 24-72 h. Una vez desmoldadas, se almacenaron en ambiente de humedad controlada 52,9 % HR.

### **Separación de amilosa de mandioca y obtención de películas**

La obtención de amilosa se llevó a cabo utilizando el método propuesto por Mukerjea & Robyt, (2009) con algunas modificaciones. La preparación de las películas constó de las siguientes etapas: *homogeneización de los componentes e hidratación del almidón, gelatinización de la suspensión acuosa, separación física de la amilosa, casting y secado de films*.

Para las etapas de homogeneización, hidratación y gelatinización se aplicaron los procedimientos y condiciones detalladas en la obtención de películas de almidón nativo.

*Etapas de separación física de la amilosa:* una vez finalizado el proceso de gelatinización, las soluciones filmogénicas se enfriaron hasta a 40 °C y se incorporaron 175 mL de n-butanol, se mantuvo bajo agitación constante por 72 h a 25 °C. Una vez homogenizada la solución se centrifugó a 4500 rpm por 1 h. Luego, se resuspendió el precipitado en 250 mL de agua destilada y se destiló por arrastre de vapor para eliminar el n-butanol de la solución.

*Etapas casting y secado de films:* una vez obtenida la solución destilada se dejó enfriar a 80 °C y se colocaron 100 mL en moldes circulares de TEFLON ® de 19 cm de diámetro. Las películas fueron secadas a temperatura y humedad ambiente durante 24-72 h. Una vez desmoldadas, se almacenaron en ambiente de humedad controlada 52,9% HR.

### **Separación de amilopectina de mandioca y obtención de películas**

Luego de realizar las etapas de *homogeneización de los componentes e hidratación del almidón, gelatinización de la suspensión acuosa*, descritas en el apartado anterior, *la separación física de la amilopectina fue llevada a cabo de la siguiente manera:*

Una vez finalizado el proceso de gelatinización, las soluciones filmogénicas se enfriaron hasta 40 °C y se incorporaron 175 mL de n-butanol, se mantuvo bajo agitación constante por 72 h a 25 °C. Una vez homogenizada la solución se centrifugó a 4500 rpm por 1 h luego el sobrenadante se destiló por arrastre de vapor para eliminar el n-butanol de la solución.

*Etapas casting y secado de films:* una vez obtenida la solución destilada se dejó enfriar hasta una temperatura de 80°C y se colocaron 100 mL en moldes circulares de TEFLON ® de 19 cm de diámetro. Las películas fueron secadas a temperatura y humedad ambiente durante 24-72 h. Una vez desmoldadas, se almacenan en ambiente de humedad controlada 52,9% HR.

### **Películas de acetato de almidón de mandioca (AAM) de alto grado DS=2,9**

Las soluciones filmogénicas utilizadas para la formulación de las películas de acetato de almidón de mandioca, fueron resultado de la aplicación de un diseño experimental de tipo factorial 2<sup>2</sup> teniendo como variables:

- 1) La concentración de AAM (2,5 % y 5%).
- 2) La concentración de plastificante (20% y 50%) (Porcentaje de plastificante referido a la masa de AAM en la solución). La variable de respuesta fue la evaluación de formación de la película.

Una vez resuelta la formulación con plastificante, el proceso de conformación de las películas constó de 2 etapas: *homogeneización de los componentes de las soluciones filmogénicas, casting y secado de films*.

*Etapas de homogeneización de los componentes de las soluciones filmogénicas:* las soluciones filmogénicas utilizadas para la formulación de las películas fueron:

- Solución de AAM, DS 2,8 en cloroformo al 5 % (p/v).
- Solución de AAM, DS 2,8 en cloroformo al 5 % (p/v) + DSA al 50 %

El porcentaje de plastificante está referido a la masa de AAM en la solución. Se introdujo un tiempo de espera de 4 h a las soluciones filmogénicas para favorecer la plastificación del polímero antes del moldeo.

*Etapas de casting y secado de films:* las películas se formaron por “casting” volcando 60 mL de la solución filmogénica en moldes de TEFLON® de 10 cm de diámetro a 25 °C y dejando evaporar el solvente por 24 h. Una vez desmoldadas, se almacenan en ambiente de humedad controlada 52,9% HR.

## Caracterización de películas

### Espesor

El espesor de la película se midió con un micrómetro electrónico Fowler, Cole-Parmer Instruments Co. (0.001 mm de precisión). El espesor informado fue el valor medio de cinco mediciones y se usó como el espesor de la muestra para los cálculos de permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas.

### Humedad

La humedad de las películas se determinó midiendo la pérdida de peso de las mismas luego de ser secadas en una estufa a 105 °C hasta peso constante. Las muestras se analizaron al menos por triplicado y los resultados fueron expresados en porcentaje (%).

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \quad (3.1)$$



Donde  $m_i$  es la masa inicial del film y  $m_f$  es la masa final del mismo.

### Propiedades mecánicas cuasi-estáticas

Los ensayos de tracción se realizaron con una máquina de tensión/ compresión marca Adamel Lhomagry (Francia) modelo DY 32 con celda de carga de 1 kN, con una exactitud de 0,5% (0,1% a fondo de escala), rango de velocidades de 0,01 a 999 mm/min y con registro automático de tensión –deformación. Equipo localizado en el PROCYP- IMAM-UNaM.

Se Utilizaron probetas de 2,5 x 5 cm registrándose tracción (Newton)-deformación (mm) y energía almacenada hasta la rotura (mJ) absorbida y se empleó una velocidad de constante de 0,4 mm/min.

### Permeabilidad al vapor de agua

La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) de las películas fue evaluada con el método cuasi-isostático, ya utilizado en envases de yerba (Ramallo & Albani 2004) y siguiendo el procedimiento general descrito en la norma ASTM E96 (Methods, 2003).

Las celdas empleadas en el laboratorio tienen un área de transferencia de 0.058 m<sup>2</sup> y las experiencias se llevaron a cabo por triplicado. Las humedades relativas externas se fijaron empleando soluciones salinas saturadas (ClNa para 75% HR) y se utilizó sílica gel como 0% de HR. La temperatura de las cabinas de ensayo se mantuvo constante en estufa con una precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

Se registró la variación de peso de la celda en una balanza electrónica marca A & D Co., con precisión de 0,001 g.

La permeabilidad de los materiales se cuantificó utilizando el coeficiente de permeabilidad, de acuerdo a (Robertson, 2013)

$$P = \frac{Qx}{At(p_1 - p_2)} \quad (3.2)$$

Donde Q es la cantidad de permanente difundiendo a través de un espesor x, un área A, en un tiempo t, para presiones parciales  $p_1$  y  $p_2$  a cada lado del film.

El pasaje de agua a través del film WVTR se expresó con la siguiente ecuación:

$$WVTR = \frac{Q}{At} \quad (3.3)$$

Donde Q es la cantidad de permanente difundiendo a través de la película, un área A, en un tiempo t.

### **Solubilidad**

Se determinaron las solubilidades de las películas bajo dos condiciones diferentes: en agua desionizada a 25 °C y en solución de HCl 0.1 M a 37 °C. Esta última condición simula las condiciones de digestión gástrica, ya que las películas de almidón además de ser biodegradables son comestibles. Muestras de películas de 2 x 3 cm fueron almacenadas en un desecador con sílica gel durante 7 días. Las muestras se pesaron (peso seco inicial) y se colocaron en vasos de precipitados que contenían 80 mL de agua desionizada o de solución de HCl 0.1 M. Las muestras fueron mantenidas con agitación constante a 200 rpm durante 1 hora a la temperatura correspondiente (25 y 37 °C). Luego, fueron recuperadas por filtración y secadas en una estufa a 60 °C hasta peso constante (peso seco final). El porcentaje total de materia soluble (% de solubilidad) fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Solubilidad} = \left[ \frac{(\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final})}{\text{Peso seco inicial}} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

Para cada condición, todas las muestras se analizaron al menos por duplicado.

### **Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros de infrarrojo de las películas se registraron en un espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier Nicolet Nexus, (Madison, WI, USA) utilizando el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), localizado en el LPYMC, IFIBA- UBA. Las mediciones se obtuvieron como el promedio de 32 exploraciones, en el rango de 4000 cm<sup>-1</sup> a 600 cm<sup>-1</sup>, con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>.

### **Difracción de Rayos X**

Los patrones de difracción de rayos X de las películas se midieron con un difractómetro de rayos X Siemens D 5000 (Texas, USA) radiación  $\alpha$  de CuK y longitud de onda de 1.54 Å, localizado en el DQIAQF/ INQUIMAE- FCEYN- UBA. La operación se realizó a una tensión de 40 kV y una corriente de 30 mA. Los datos se recolectaron con un contador de centelleo en un ángulo de dispersión 2 $\theta$  en el rango de 5-35° con un

tamaño de paso de  $0.02^\circ$ . Se probaron tres réplicas para cada sistema. El error estándar fue del 2%. Se presentó una curva representativa para cada sistema.

El porcentaje de cristalinidad fue calculado a partir de la integración de las áreas de cada difractograma, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de cristalinidad} = \frac{100 \cdot AC}{AT} \quad (3.5)$$

Donde  $AC$  fue el área cristalina y  $AT$  fue el área total del difractograma.  $AC$  se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$AC = AT - AA \quad (3.6)$$

Donde  $AA$  fue el área de la zona amorfa (considerada como la línea base de cada difractograma).

### **Microscopía electrónica de Barrido (SEM)**

La homogeneidad y apariencia de las películas se evaluó con un microscopio electrónico JEOL JSM 6360 (Tokio, Japón), utilizando un voltaje de aceleración de 10 kV, localizado en el Pabellón 1, IFIBA - UBA. Para las observaciones de secciones transversales, las películas fueron crio fracturadas por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras se montaron en tacos de bronce con una cinta bifaz y se recubrieron con una capa de oro (40-50 nm) utilizando una máquina de recubrimiento por pulverización catódica al vacío, permitiendo así la visualización de las superficies y de las secciones transversales.

### **Propiedades Térmicas**

Se usó un analizador termogravimétrico / diferencial simultáneo TGA / DTA-DTG-60 Shimadzu, (Kyoto, Japón), localizado en el LPYMC, IFIBA- UBA, para evaluar la estabilidad térmica de las películas. Aproximadamente 10 mg de muestra se sometieron a calentamiento de  $30^\circ\text{C}$  a  $500^\circ\text{C}$  a una velocidad de  $10^\circ\text{C} / \text{min}$  en una atmósfera de nitrógeno seco y un caudal de nitrógeno de  $30 \text{ mL} / \text{min}$ . Las propiedades térmicas de las películas se analizaron mediante TGA y DTA. Los ensayos se realizaron por triplicado. El error estándar en cada sistema fue inferior al 1%. Se informaron las curvas representativas de cada sistema.

### **Ensayos cualitativos de biodegradabilidad en tierra**

Las películas fueron cortadas en cuadrados de 2 cm x 2 cm. El *compost* orgánico, que se usó para simular el suelo se tamizó para eliminar grandes grumos y se vertió en una bandeja de plástico hasta un espesor de aproximadamente 6 cm. Las muestras se enterraron por debajo de 4 cm de suelo, a temperatura ambiente ( $\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y condiciones de humedad (70–80%). Se roció agua dos veces al día para mantener la humedad del *compost*. Las películas se retiraron en diferentes momentos y se secaron en un horno de vacío a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente se fotografiaron a fin de registrar los cambios en la apariencia.

### **Efecto del almacenamiento de las películas**

Las películas fueron almacenadas por 1 año en atmosfera de humedad controlada al 52,9 % HR para evaluar su envejecimiento. Otras muestras, fueron evaluadas dentro de los 10 días de haber sido moldeadas (películas nuevas). En ambos casos, se realizó la caracterización de las propiedades mas relevantes.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

### **Películas de almidón, amilosa y amilopectina**

Las soluciones obtenidas luego del proceso de gelatinización del almidón fueron de una menor viscosidad en comparación a las soluciones obtenidas por el proceso de gelatinización en placa (a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), el hecho de que el proceso térmico ayude a disminuir la viscosidad de la solución fue de especial interés para la posterior separación del almidón en sus fracciones (amilosa y amilopectina). Si bien es esencial minimizar la hidrólisis y la oxidación, el proceso de gelatinización debe garantizar que los granos de almidón estén completamente gelatinizados, desintegrados y solubilizados (Bader & Göritz, 1994; Denis Lourdin, Valle, & Colonna, 1995). Por otro lado, ya que la completa solubilización de la amilosa solo es posible a altas temperaturas ( $T > 130^{\circ}\text{C}$ ) (Protzman, T. Wagoner, 1964), en el presente trabajo se llevó a cabo la gelatinización del almidón a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a presión supratmosférica, mediante la utilización de autoclave. La separación de la amilosa una vez obtenida la solución filmogénica, fue posibilitada por la incorporación del n-butanol que actuó como agente complejante y si bien en primer momento se pensó en que podría actuar como plastificante externo en la formación de películas; en el momento del casteo, fue un requisito indispensable la

eliminación del mismo mediante destilación por arrastre de vapor. La presencia del n-alcohol genera manchas en las películas, fenómeno que fue observado también por (Wolff, Davis, Cluskey, Gundrum, & Rist, 1951).

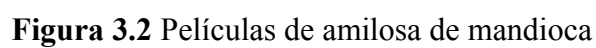
Debido a las diferencias en las solubilidades de los almidones en función de su origen botánico y/o de su contenido de amilosa, las soluciones acuosas son normalmente inestables. Este hecho genera que las soluciones tiendan a gelificarse inmediatamente se produce el enfriado (Young, (1984)), por esta razón, la etapa de casteo se realizó por encima de los 80 °C. Con respecto al secado, en el presente trabajo se buscó evitar procesos rápidos que puedan provocar grietas, deformaciones o marcas de secado, así como el secado excesivo que podría derivar en films muy quebradizos (Protzman, T. Wagoner, 1964). Por esta razón las películas fueron casteadas en moldes antiadherentes de TEFLON®, y secadas a temperatura y humedad ambiente por 24-72 h.

El espesor de la película se controla aproximadamente por la concentración de sólidos y la cantidad de solución moldeada en el soporte (Wolff et al., 1951). A partir de las soluciones preparadas siguiendo la metodología planteada se obtuvieron espesores de películas que variaron entre  $0,030 \pm 0,005$  mm (amilosa y almidón nativo) y  $0,060 \pm 0,007$  mm (amilopectina). Es importante mencionar que las películas obtenidas fueron continuas y de espesor suficiente a pesar de la baja concentración con la que fueron preparadas. Liu, (2005) y López, García, & Zaritzky, (2008), sostienen que por debajo de una concentración del 4 % p/p de almidón, es difícil obtener una película con estas características, para almidones gelatinizados a 90 °C por tiempos relativamente cortos. El autor de este trabajo atribuye este comportamiento diferente (soluciones muy diluidas y obtención de películas uniformes y delgadas) al tratamiento térmico utilizado en el proceso de gelatinización del almidón, a la temperatura de colada y al proceso de secado del film. En la figura 3.1; 3.2 y 3.3 se muestran las películas de amilopectina, amilosa y almidón nativo obtenidas.



**Figura 3.1** Películas de amilopectina de mandioca







**Figura 3.3** Películas de almidón nativo de mandioca

### Humedad

El contenido de humedad de las películas sin plastificar resultó afectado por la composición de las mismas, pero en general, tuvieron un porcentaje de humedad del 10-12 % para películas recién moldeadas, sin estabilizar y en el orden del 3-5 % para películas almacenadas un año en 52,9 % HR.



**Tabla 3.1.** Humedad de películas de almidón de mandioca nativo, amilosa y amilopectina almacenadas durante 1 año y para películas nuevas (tiempo 0).

	<b>Tiempo 0</b>	<b>1 año de almacenamiento</b>
<b>Película</b>	<i>% de humedad</i>	<i>% de humedad</i>
<i>Almidón</i>	11	4
<i>Amilosa</i>	12	5,65
<i>Amilopectina</i>	10	3

### **Solubilidad**

La solubilidad de las películas en agua es una propiedad tenida en cuenta, ya que condiciona la aplicabilidad de las mismas, sobre todo si se utiliza la película como envase o recubrimiento. En algunos casos, se requiere que las mismas sean insolubles en agua para mejorar la integridad del producto que contienen o recubren, y en otros casos que se solubilizan en agua a fines de poder usarlas, por ejemplo, en productos hidrófobos como aceites. La disolución de las películas antes del consumo del producto puede resultar útil, como en el caso de la encapsulación de alimentos o aditivos (M. A. Bertuzzi, Armada & Gottifredi, 2007). Los resultados obtenidos de solubilidad de las películas se presentan en la Tabla 3.2

**Tabla 3.2.** Solubilidad de películas a 25 °C en agua y a 37°C en HCl 0,1M para películas de almidón, amilosa y amilopectina.

<i>Matriz</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>solubilidad</i> (%)
Amilosa mandioca <sup>a</sup>	25	0±0,00
Amilopectina de mandioca <sup>a</sup>	25	100±0,00
Almidón nativo <sup>a</sup>	25	22,2±0,09
Amilosa mandioca <sup>b</sup>	37	9±0,00
Amilopectina de mandioca <sup>b</sup>	37	100±0,00
Almidón nativo <sup>b</sup>	37	40,4±0,50

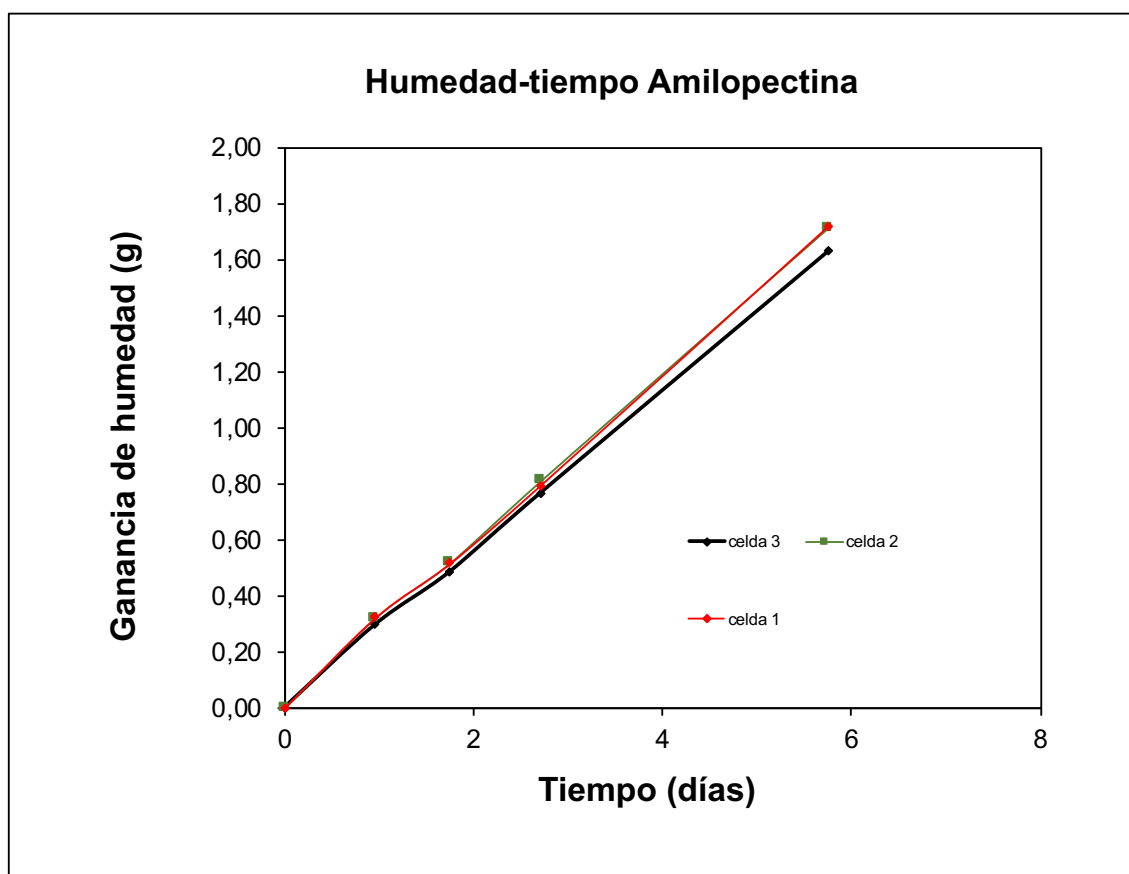
<sup>a</sup> Ensayos realizados en agua desionizada.

<sup>b</sup> Ensayos realizados en HCl 0,1 M.

La solubilidad en ácido, es una información de interés, desde el punto de vista de digestividad de las películas, a fines de evaluar si podrían ser consideradas como recubrimientos comestibles. Como pudo comprobarse las películas de amilosa resultan prácticamente insolubles en ácido, las de amilopectina son solubles en un 100% y las de almidón aumentan significativamente su solubilidad en comparación a los resultados en agua a 25 °C.

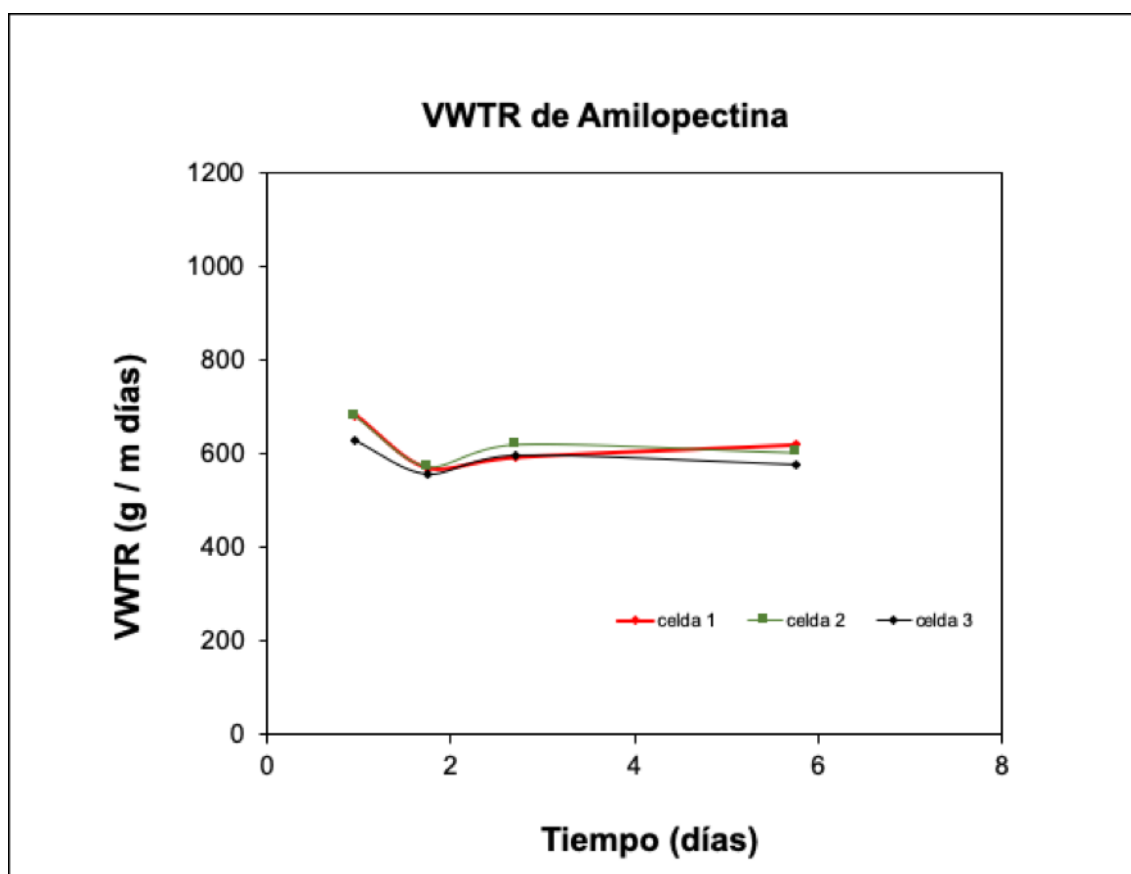
### Propiedades de Permeación al Vapor de agua

Los valores medidos para el aumento de peso en una celda con una película de amilopectina, en un ensayo de permeabilidad siguiendo la norma ASTM E96/00 se muestran en la Figura 3.4. Puede observarse la buena linealidad de la medida en el tiempo de ensayo.



**Figura 3.4** Ganancia de peso para amilopectina T=25 °C, presión de equilibrio 75% HR

En la Figura 3.5. se presentan los de WVTR para una película de amilopectina medida de acuerdo a ASTM-E96.



**Figura 3.5** Valores de WVTR para una película de amilopectina medida según norma ASTM E-96

Los valores de velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR) calculados para almidón de mandioca, amilopectina y amilosa de mandioca se muestran en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Valores de Permeabilidad y Velocidad de Transmisión al Vapor de Agua en celdas de 0% HR interno, expuestas a condiciones ambientales 75% HR y 25°C.

<i>Película</i>	<i>P (g /m s Pa)</i>	<i>WVTR (g /m<sup>2</sup> s)</i>
Almidón	$6,63 \cdot 10^{-11}$	$7,88 \cdot 10^{-03}$
Amilosa	$8,21 \cdot 10^{-11}$	$6,97 \cdot 10^{-03}$
Amilopectina	$8,11 \cdot 10^{-11}$	$4,20 \cdot 10^{-03}$

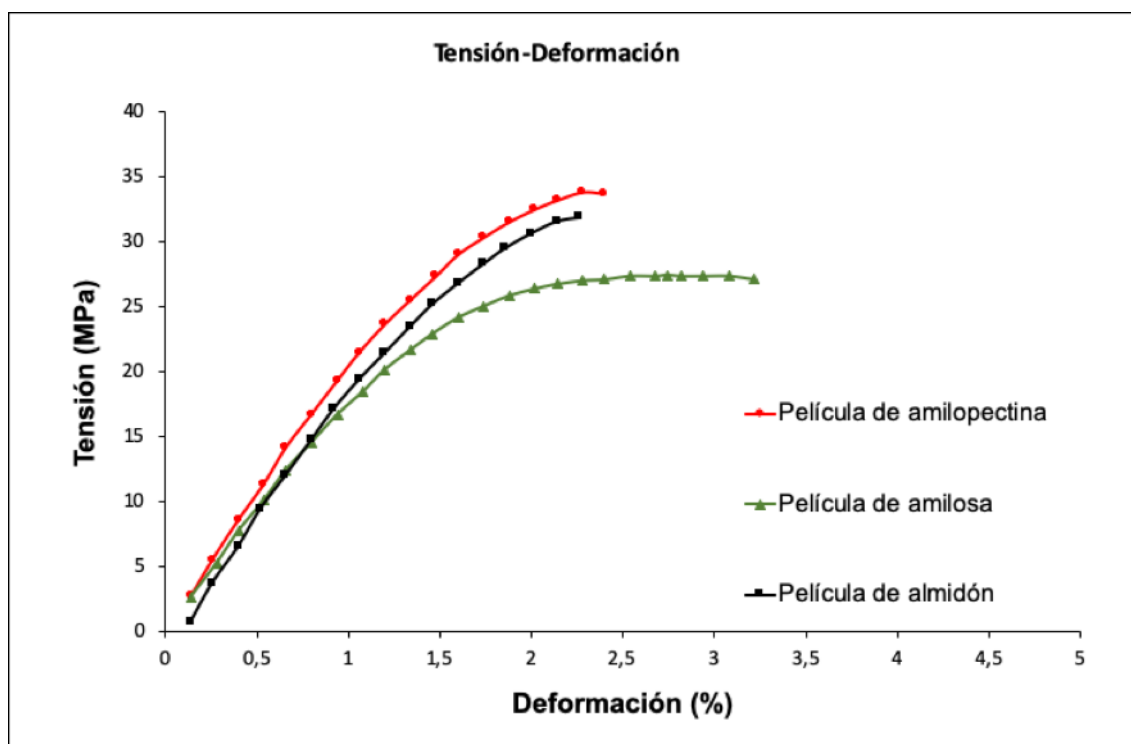
Las permeabilidades de las películas están en el orden de los reportados en la bibliografía (Mali et al. 2006, Bertuzzi et al., 2007). Gennadios et al., (1994) miden para películas de amilosa un valor de  $P=3,8 \cdot 10^{-10}$  g/msPa, en tanto Flores et al., (2007)

encuentran para películas de almidón de mandioca valores entre  $6,3 \cdot 10^{-10}$  g/msPa y  $1,4 \cdot 10^{-11}$  g/msPa cuando distintas velocidades de calentamiento son utilizadas en la gelatinización de la solución de almidón.

Sin embargo, como las películas tienen espesores distintos (entre 0,028 mm y 0,067 mm) las medidas tienen que ser comparadas con cuidado pues como es sostenido por Bertuzzi et al., (2007) puede haber una relación no esperada del valor de la permeabilidad y el WVTR debido a que la mayor resistencia a la difusión se concentraría en la parte con menor humedad de la película debido al método de medida, lo que daría una relación no lineal de P con el espesor de la película.

### Propiedades Mecánicas de las películas de almidón, amilosa y amilopectina

En la Figura 3.6 se presenta el diagrama Tensión- Deformación para las películas de almidón, amilosa y amilopectina y en la Tabla 3.4 los valores obtenidos de las propiedades mecánicas.



**Figura 3.6** Diagrama Tensión- Deformación para películas de almidón, amilosa y amilopectina

Las películas de almidón como las de amilopectina y amilosa exhibieron el clásico comportamiento de un material basado en almidón sin agregado de plastificantes, soportando grandes tensiones, pero deformándose pobremente. Existe una diferencia en cuanto a la elongación de las películas de amilosa con respecto a las de almidón y amilopectina, esto podría deberse a que las cadenas de amilosa son lineales, lo que facilitaría un mayor movimiento de deslizamiento entre las cadenas en el film. Alves et al., (2007) reportan valores mayores de tensión (52,8 MPa) para películas de mandioca enriquecidas en amilosa. Los valores obtenidos en este trabajo, para tensión de rotura en films de amilosa de mandioca son similares a los obtenidos por Bertuzzi et al., (2012) en almidón de alta amilosa de maíz, sin plastificantes.

**Tabla 3.4.** Propiedades mecánicas medidas para película de almidón nativo, amilosa y amilopectina.

<i>Película</i>	<i>Tracción (MPa)</i>	<i>Elongación %</i>	<i>Energía (mJ)</i>
Amilopectina de Mandioca	34	2,40	34483,78
Amilosa de Mandioca	27	3,22	29763,65
Almidón	31,9	2,26	32461,20

### Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X (DRX) se emplea para investigar las estructuras semicristalinas del almidón. Se identifican tres patrones principales de DRX a saber: A, B y C (Sarko & Wu, 1978). En general, los almidones de tubérculo muestran una estructura cristalina de tipo B. La introducción de agentes complejantes en las preparaciones de almidón, perturba la conformación de la doble hélice, formando hélices de conformación V de cadena simple estable. La conformación V es el resultado del acomplejamiento de la amilosa con sustancias tales como ácidos grasos alifáticos, surfactantes, emulsificantes, n-alcoholes, glicerol, dimetilsulfóxido. Cuando la amilosa coexiste con lípidos polares, se forman estructuras V como resultado de la gelatinización, ya sea durante el calentamiento o el enfriamiento (Liu, 2005).

El análisis de los difractogramas obtenidos para las distintas películas fue complejo, debido a que en todos los casos los materiales resultaron amorfos, observándose pocos picos cristalinos y de baja intensidad, manteniéndose esta tendencia no solo en los

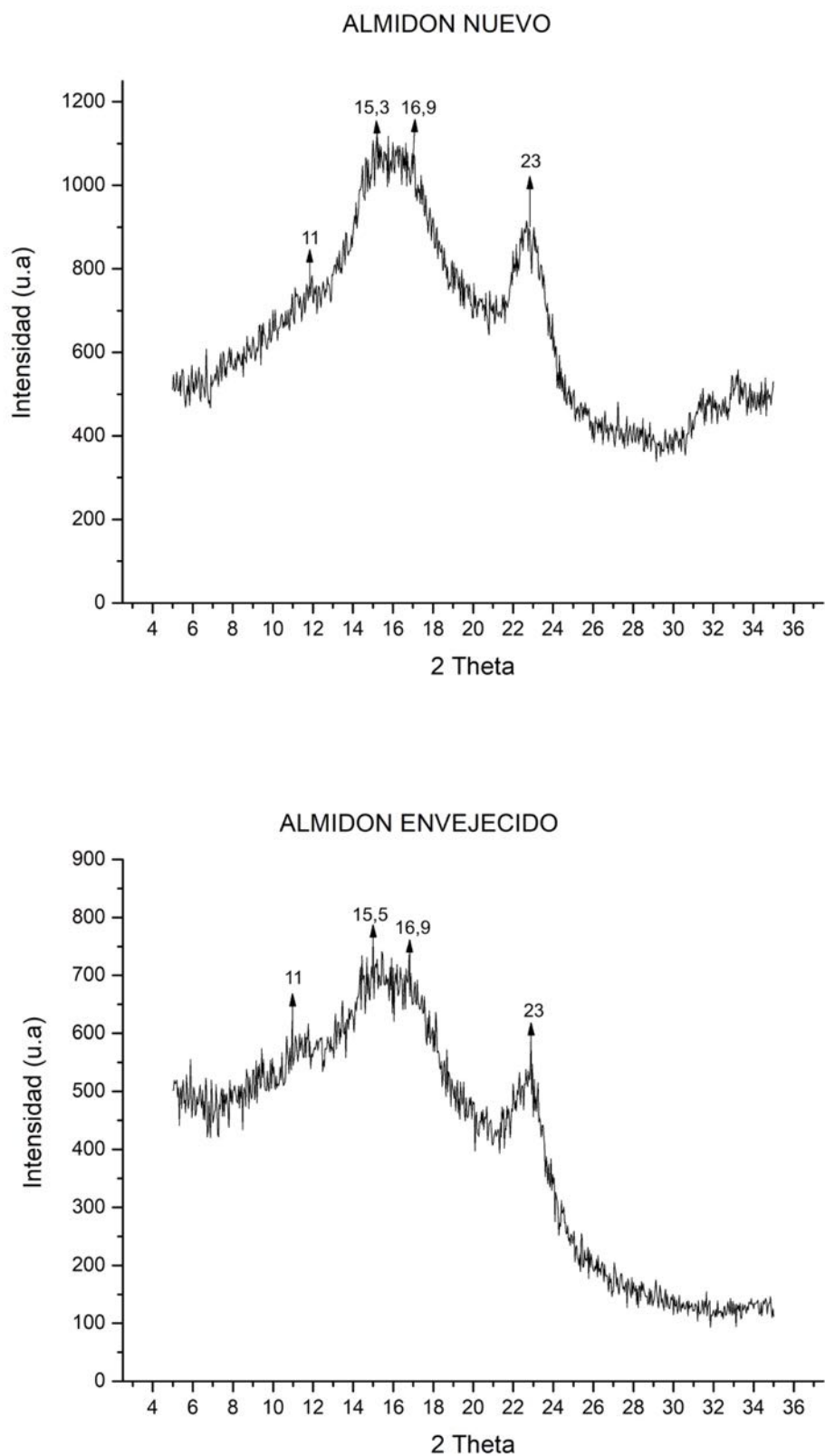
materiales recién moldeados sino también en aquellas películas que fueron almacenadas. Algunos picos que pudieron observarse, podrían ser coincidentes con los característicos asignados para el polimorfo A. En particular, tres picos fueron distinguidos con certeza para almidón:  $15,3^\circ$ ;  $16,9^\circ$ ;  $11^\circ$  y  $23^\circ$  para  $2\theta$  y en otros casos un pico mas fue observado ( $19^\circ$ ). Esto no sería lo esperado, ya que la bibliografía, asigna un patrón de tipo B para almidones derivados de tubérculos y V para almidones acomplexados con n-alcoholes.

La celda unitaria de los cristales de almidón de tipo B es hexagonal y consta de seis hélices dobles que encierran un gran vacío en el que pueden alojarse hasta 36 moléculas de agua (Imberty & Perez, 1988). Sin embargo, los cristales de tipo A están densamente empaquetados y consisten en siete hélices dobles en una red monoclinica escalonada y contiene solo 8 moléculas de agua por celda unitaria (Sarko & Wu, 1978).

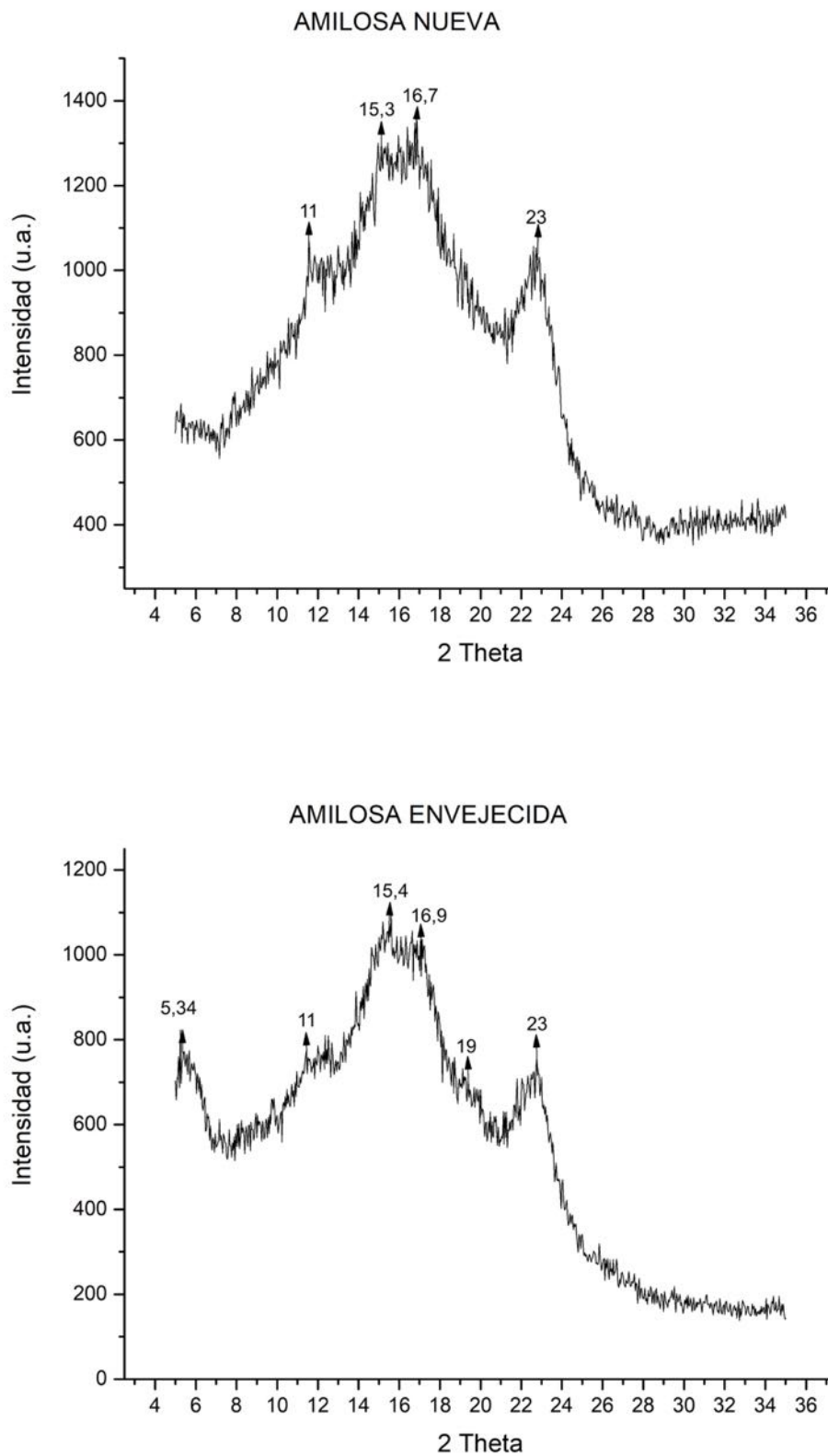
En el caso del difractograma de amilosa envejecida se observó un pico a  $5,34^\circ$  para  $2\theta$  además de los descriptos para almidón.

Los patrones de DRX de los almidones de papa y ñame se pueden modificar del tipo B al patrón de tipo A mediante tratamiento de humedad con calor (HMT) (Zavareze & Dias, 2011). Esta transición de tipo B inducida por HMT a tipo A se atribuye tanto a la deshidratación como al movimiento del par de dobles hélices en el canal central. Este movimiento durante la HMT podría alterar los cristalitos del almidón y / o cambiar la orientación cristalina (Gunaratne & Hoover, 2002).

La Figura 3.7, 3.8, 3.9 muestra los patrones de difracción de rayos X de las películas elaboradas con almidón, amilosa y amilopectina nuevas (recién casteadas) y luego de un año de envejecimiento.

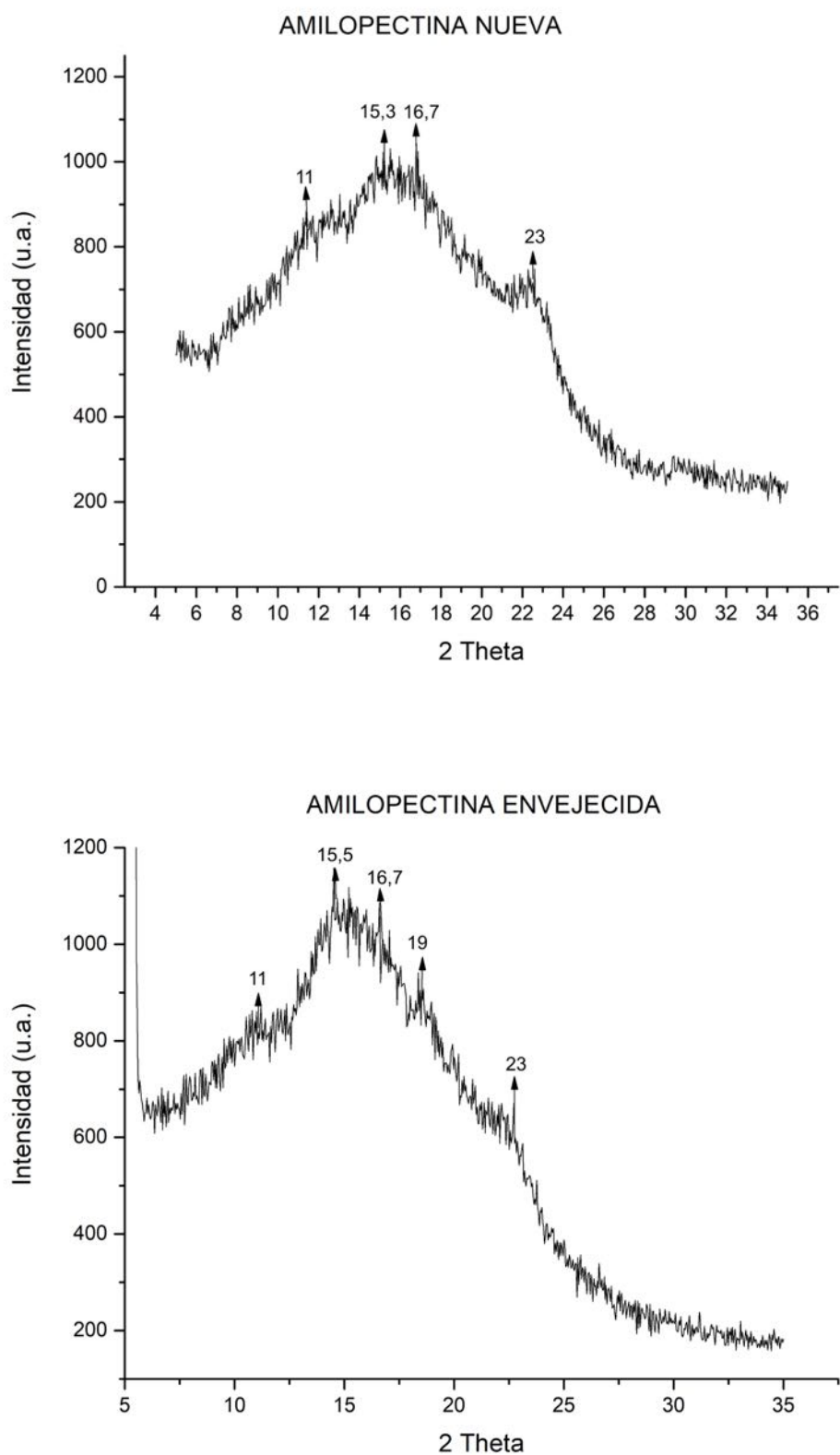


**Figura 3.7** Difractogramas de Rayos X para películas de almidón nativo de mandioca, nuevas y con un año de almacenamiento



**Figura 3.8** Difractogramas de Rayos X para películas de amilosa de mandioca, nuevas y con un año de almacenamiento





**Figura 3.9.** Difractogramas de Rayos X para películas de amilopectina de mandioca, nuevas y con un año de almacenamiento.

Los patrones de difracción por Rayos X mostrados en la Figura 3.7, 3.8 y 3.9, están caracterizados por una zona amorfa y por picos asociados a la difracción cristalina. En la Tabla 3.5. se reportan los resultados del porcentaje de la fracción cristalina de los tres sistemas, para el tiempo 0 de almacenamiento y para un año.

**Tabla 3.5.** Contenido de humedad y fracción cristalina de las películas a diferentes tiempos de almacenamiento.

<b>Película</b>	<b>Tiempo 0</b>		<b>1 año de almacenamiento</b>	
	<i>% de humedad</i>	<i>%de cristalinidad</i>	<i>% de humedad</i>	<i>% de cristalinidad</i>
<i>Almidón</i>	11	3,09	4	4,35
<i>Amilosa</i>	12	4,65	5,65	6,7
<i>Amilopectina</i>	10	1,95	3	3

Las películas de almidón recién preparadas son completamente amorfas (García et al., 2000; Myllärinen Päivi et al., 2002; Rindlav, Hulleman, & Gatenholm, 1997) aunque algunas películas de amilosa frescas pueden contener poca cristalinidad (<10%) (Myllärinen Päivi et al., 2002) esto puede observarse en los resultados obtenidos en este trabajo. La cristalinidad es baja (<5%) y acorde al contenido de humedad.

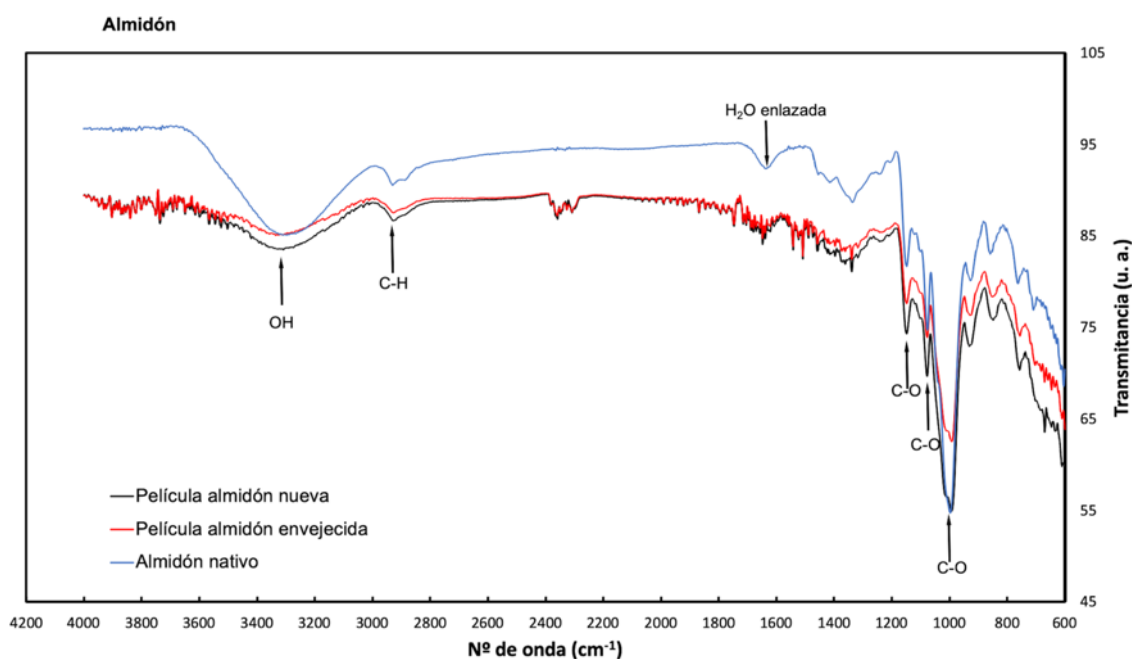
Debido a su alto peso molecular y al gran número de ramificaciones, la amilopectina retrograda o recristaliza más lentamente que la amilosa (Goodfellow & Wilson, 1990), y su mayor concentración en el almidón podría interferir con la recristalización de la amilosa. Luego de ser almacenadas por un año, puede observarse que las películas que han retrogradado en mayor medida (en función de su porcentaje de cristalinidad) fueron las de amilosa, luego las de almidón y por último y en mucho menor grado, las de amilopectina.

Como puede observarse en los resultados obtenidos, se ha conseguido retrasar de manera significativa la retrogradación de los films de almidón y sus fracciones. Famá et al., (2005), conteniendo plastificantes externos agregados (glicerol) en la formulación de sus matrices, reportan para un almacenamiento de 8 semanas una cristalinidad del 30%.

El autor de este trabajo, considera que el tratamiento térmico utilizado para la gelatinización del almidón, está directamente involucrado en la destrucción completa de la cristalita, produciendo el efecto antes mencionado.

### Espectroscopía Infrarroja (ATR / FTIR)

La ATR-FTIR tiene algunas ventajas notables sobre otros equipos para analizar la estructura del almidón: el equipo es relativamente barato, fácil de usar y mantener, y ofrece mucha flexibilidad a la hora de procesar distintos formatos de muestras. El accesorio ATR brinda la posibilidad de analizar muestras de almidón en una variedad de formas físicas, particularmente en el estado hidratado, lo que permite observar diferencias espectrales debido al nivel de hidratación. En la Figura 3.10 se muestra el espectro completo correspondiente a una muestra de almidón nativo (gránulos) y de dos películas de almidón, una recién casteada y la otra con 1 año de almacenamiento. Las principales bandas de absorción que surgen del almidón se pueden observar en la región de  $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ , que son producto del estiramiento C-O, C-C y C-O-H y la flexión C-O-H, como se discutió en el capítulo anterior.



**Figura 3.10** ATR/FTIR de almidón nativo (gránulos), películas de almidón nuevas y películas de almidón envejecidas

Se ha demostrado que las bandas en la región  $1100 - 900\text{ cm}^{-1}$  son sensibles a los cambios en la estructura del almidón, en particular las bandas a 1000, 1022 y  $1047\text{ cm}^{-1}$  se han estudiado ampliamente (Van Soest, Hullemann, De Wit, & Vliegenthart, 1996; Warren, Gidley, & Flanagan, 2016; Wilson & Belton, 1988) utilizando un rango de

muestras que incluyen almidones gelatinizados y retrogradados. Van Soest et al., (1996) establecen diferencias entre los polimorfos de almidón (A B y C), a partir de FTIR, en el patrón de enlaces de hidrógeno, el contenido de agua y la conformación de las cadenas del almidón, la helicidad, la cristalinidad y los procesos de retrogradación.

En la Figura 3.11 se muestra una ampliación de la región  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  de la Figura 3.10. Las bandas de  $1047$ ,  $1022$  y  $861\text{ cm}^{-1}$  son sensibles a los cambios en la cristalinidad. La banda a  $1022\text{ cm}^{-1}$  aumenta con la disminución de la cristalinidad, como se observa para el caso de películas de almidón nuevas y envejecidas a diferencia del almidón nativo (gránulos), al mismo tiempo que la banda asociada a la cristalinidad  $1047\text{ cm}^{-1}$  aparece solo en el espectro de almidón nativo. Cabe mencionar, que en el proceso de retrogradación se espera un aumento del pico a  $1047\text{ cm}^{-1}$  y una disminución del pico a  $1022\text{ cm}^{-1}$ , los tiempos encontrados en la literatura indican aproximadamente 21 días para que el pico a  $1047\text{ cm}^{-1}$  sea evidente y de una intensidad considerable (Wilson & Belton, 1988). En el caso de este trabajo de tesis en las películas almacenadas por un año, el pico no se observa. Este hallazgo, soportado con los resultados mostrados en los difractogramas de rayos X, conducen a la conclusión de que el proceso de retrogradación característico que se da en los films de almidón fue retrasado de manera fehaciente.

Van Soest et al., (1996), advierten que el calentamiento a temperaturas por encima de  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  para contenidos de hasta el 26% de agua produce la fusión de los cristalitos durante la gelatinización logrando una pérdida del orden en un 60% para temperaturas de  $104\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Esto colabora a la teoría de que el calentamiento a alta temperatura de soluciones muy diluidas por tiempos largos, provoca la destrucción de los cristalitos, hecho que se demuestra claramente en las películas desarrolladas en este trabajo.

Es necesario remarcar que las bandas de IR a  $1077$  y  $994\text{ cm}^{-1}$  no muestran cambios significativos con la disminución de la cristalinidad.

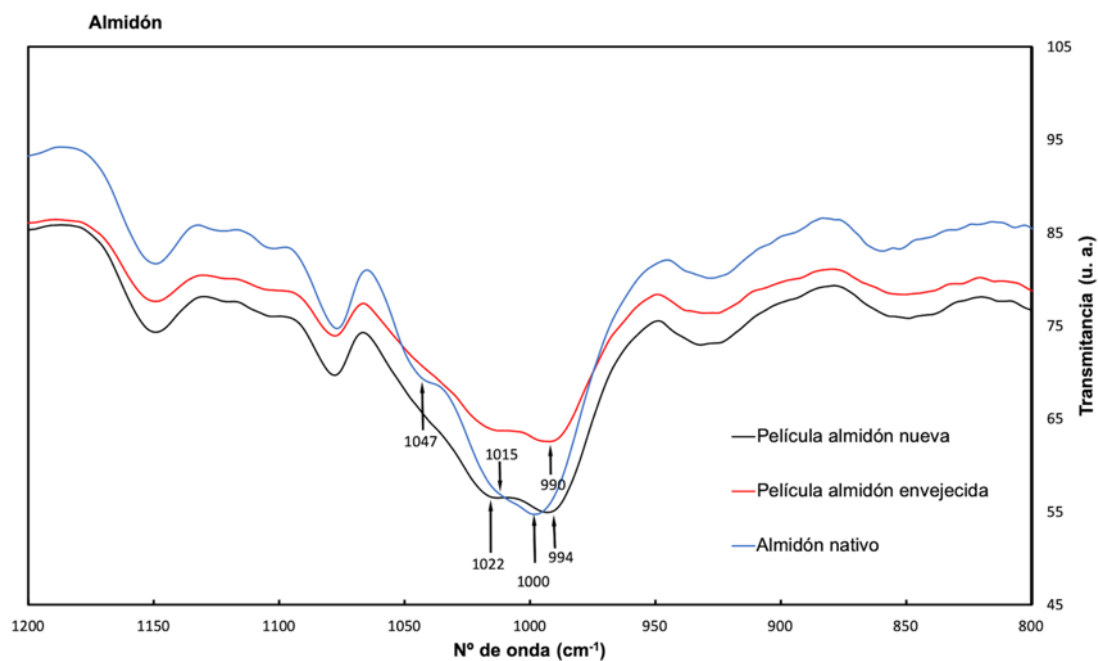
La variación de la banda a  $990\text{ cm}^{-1}$ , es sensible al contenido de humedad. Van Soest et al., (1996) encontraron que para contenidos cercanos a 0% HR la señal no se desplaza de esta región, pero para contenidos superiores al 10 % la banda se corre hasta  $1003\text{ cm}^{-1}$  sin cambios significativos hasta humedades del 40 %. Este comportamiento se adjudican, principalmente, a las vibraciones de flexión de C-O-H que son sensibles al contenido de agua e implican la interacción agua-almidón mediante, por ejemplo,

enlaces de hidrógeno, que influirán en los modos de flexión de C-O-H. (Wilson & Belton, 1988).

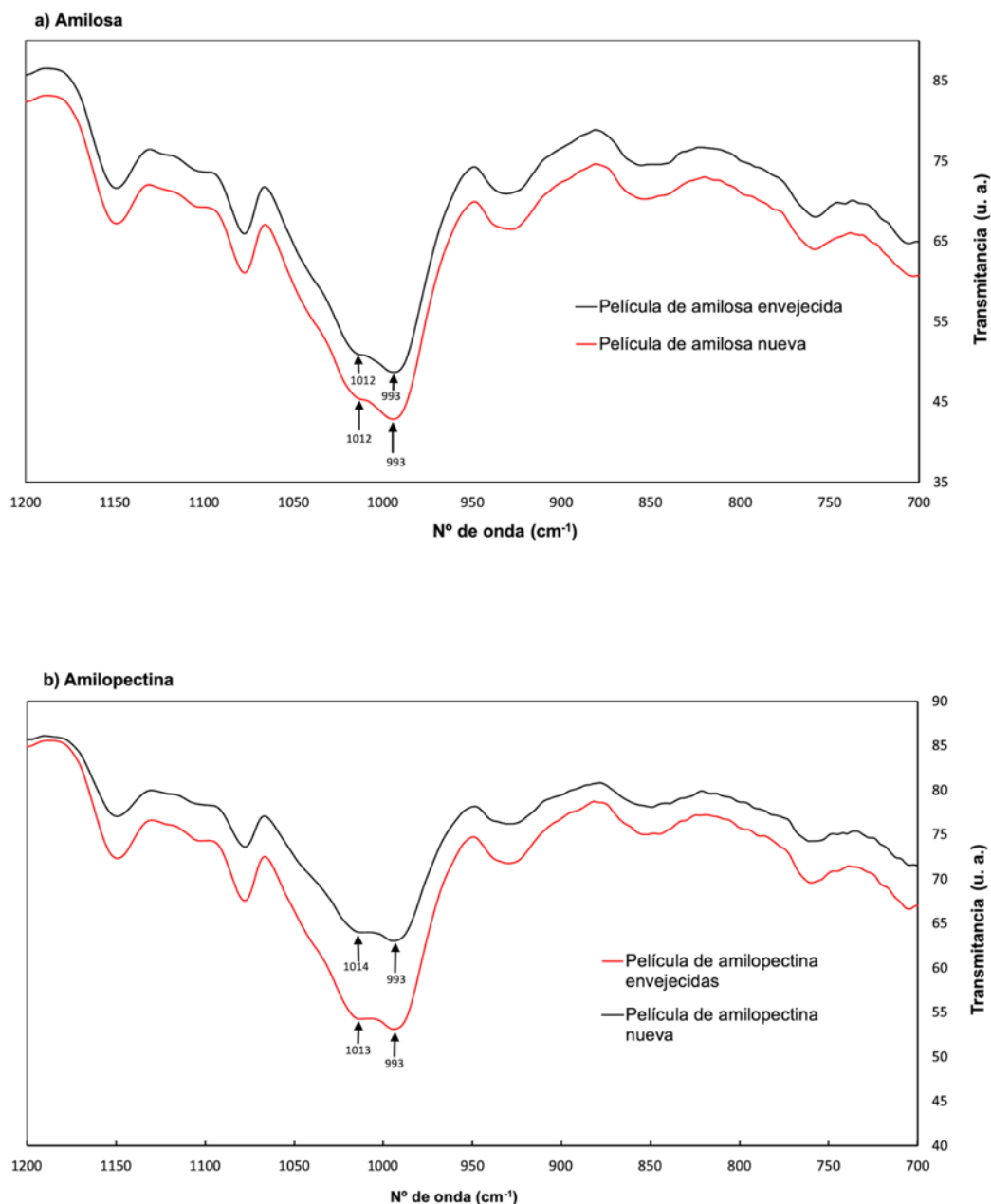
Una inspección visual de los espectros indica que hay una variación significativa en la señal a  $990\text{ cm}^{-1}$ , para cada una de las muestras. Las películas envejecidas mostraron la variación menos marcada, hecho asociado al bajo contenido de humedad de las mismas, mientras que para las películas recién casteadas la banda se desplazó a  $994\text{ cm}^{-1}$ . La variación mas importante se observó en la señal del almidón nativo (gránulos), cuya banda se desplazo a  $1000\text{ cm}^{-1}$ , generando el corrimiento adicional de la banda de  $1022\text{ cm}^{-1}$  a  $1015\text{ cm}^{-1}$ , hecho también mencionado en los estudios de Van Soest.

Por ultimo, y a fines de justificar la inversión de la estructura cristalina de tipo B a A, en cuanto al espectro FTIR, el hombro de  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ , presenta intensidades relativas distintas entre los films y el almidón nativo. En el modelo de estructura actual de polimorfos, los almidones B (caso del almidón nativo de mandioca) presentan interacciones con hasta 36 moléculas de agua entre las dobles hélices en el arreglo hexagonal, mientras que los almidones de tipo A solo pueden interactuar con 8 moléculas de agua. El autor de este trabajo, asocia la disminución del hombro observado en las películas, con respecto a la intensidad observada para el mismo hombro en el espectro del almidón nativo, con la inversión de la estructura cristalina de B a A.

Las películas de amilosa y de amilopectina (Figura 3.12 a) y b) respectivamente) exhiben el mismo comportamiento descrito para el caso de películas de almidón no observándose diferencias significativas en la cristalinidad con el tiempo de almacenamiento. La única diferencia sustancial, es el corrimiento de la banda de  $1022$  a  $1013$ , sin mostrar el desplazamiento en  $990\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.11** ATR/FTIR ampliación del espectro de a) Películas con 10 días de almacenamiento. b) Películas con 1 año de almacenamiento. c) almidón nativo (gránulos)

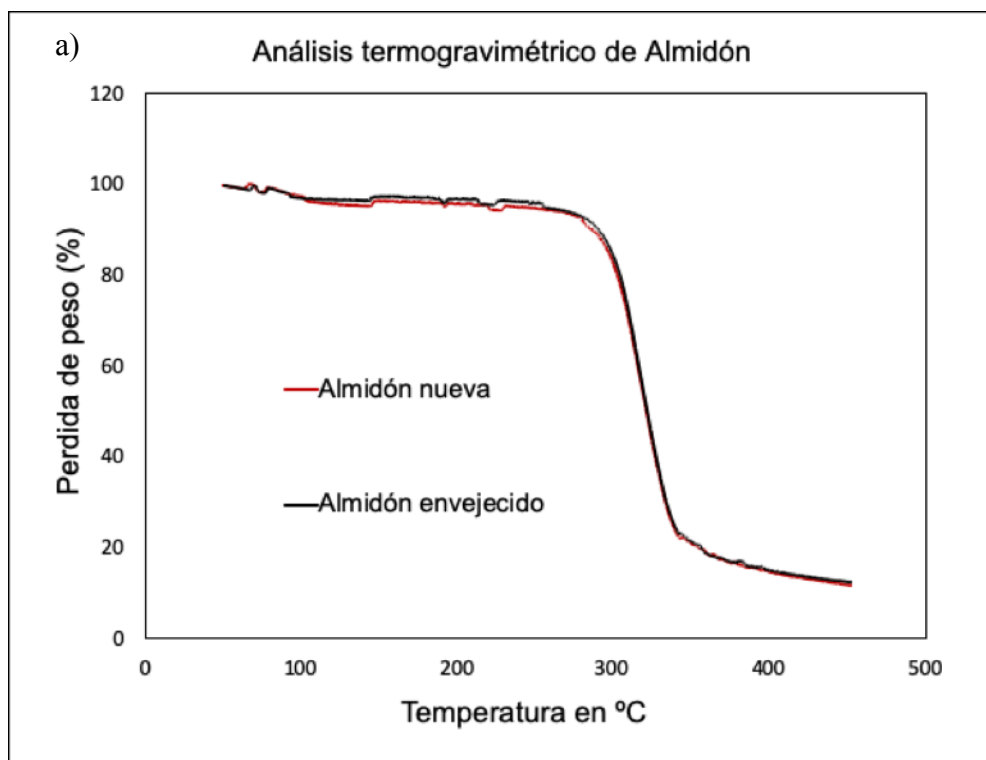


**Figura 3.12** ATR/FTIR ampliación del espectro de a) Películas con 10 días de almacenamiento y Películas con 1 año de almacenamiento de amilosa. b) Películas con 10 días de almacenamiento y películas con 1 año de almacenamiento de amilopectina

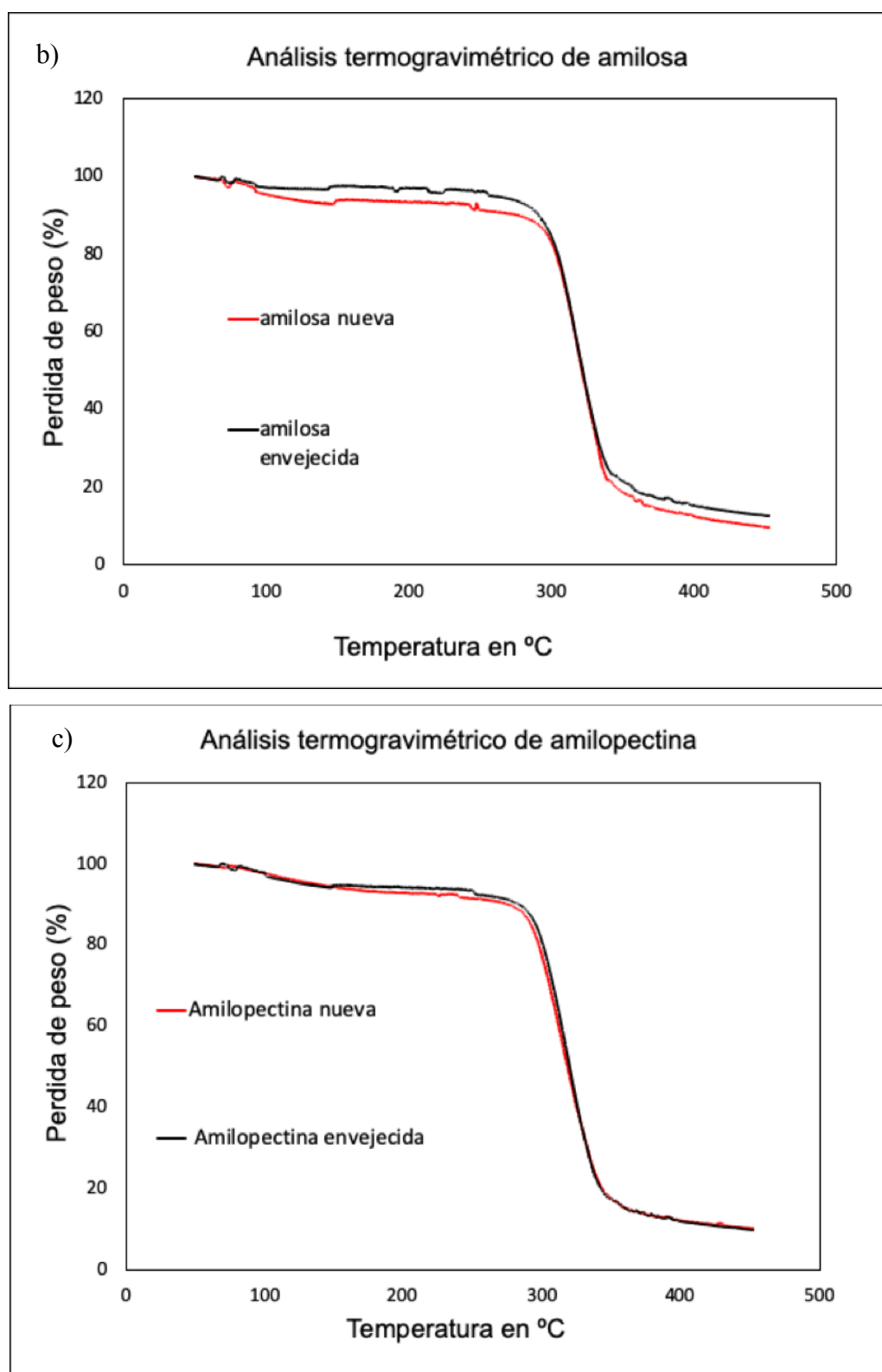
### **Análisis termogravimétrico y termodiferencial de películas de almidón, amilosa y amilopectina (TGA – DTA)**

La estabilidad térmica de las películas se muestra en la Figura 3.13. Los termogramas muestran procesos de degradación en dos etapas. La disminución de masa inicial en el rango de 100 - 120° C corresponde a la pérdida de agua y compuestos volátiles. Las

películas presentaron una pérdida de masa de aproximadamente el 6% de su masa total en esta zona. Este resultado también es consistente con el contenido de humedad total obtenido para los materiales estudiados (Tabla 3.1). El segundo proceso de degradación (280–340 °C) corresponde a la descomposición del almidón. Estos resultados son consistentes con los obtenidos para películas de almidón de mandioca por Seligra, Medina Jaramillo, Famá, & Goyanes, (2016).



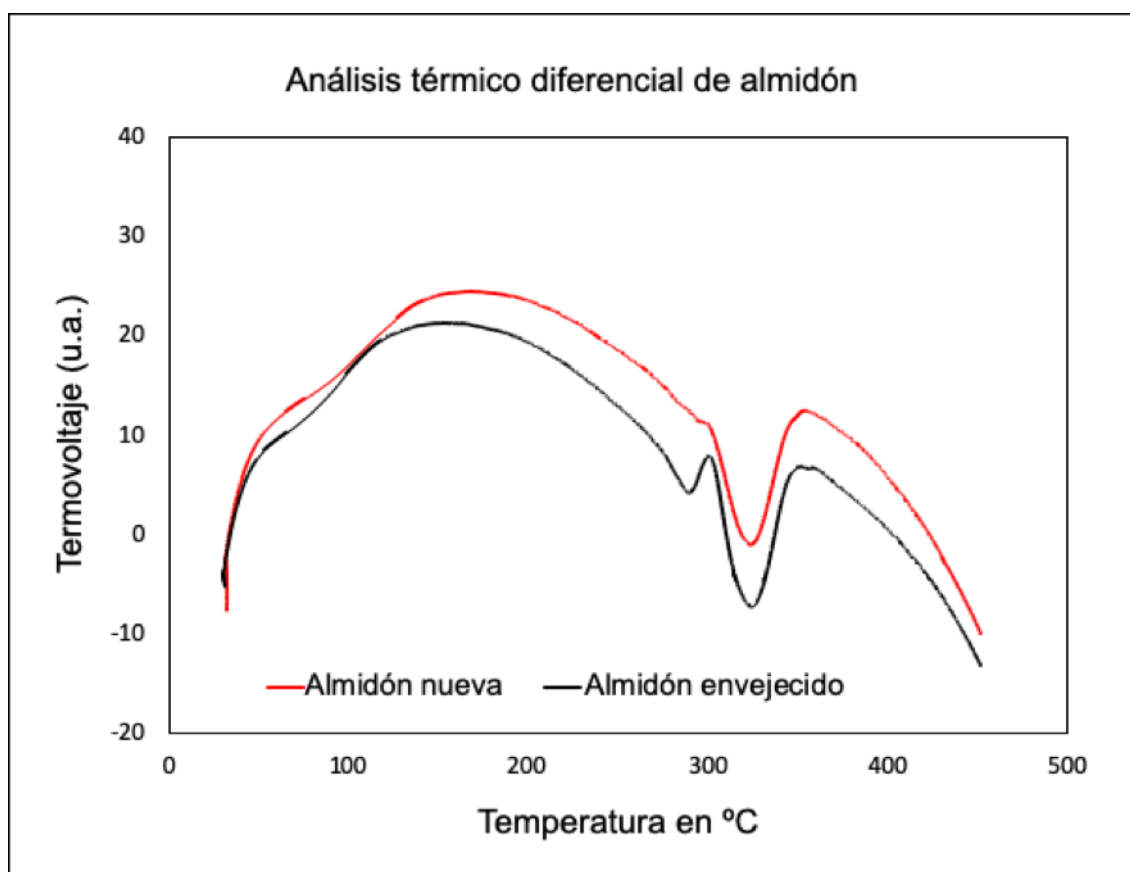




**Figura 3.13** Termogramas de películas de a) almidón, b) amilosa y c) amilopectina para distintos tiempos de almacenamiento

No pareciera haber una diferencia significativa entre las películas nuevas y las almacenadas un año, esto tiene que ver con el poco contenido de humedad y la poca retrogradación del almidón. Finalmente, es importante tener en cuenta que los resultados de TGA indican que tanto las películas recién obtenidas como las almacenadas por un año son térmicamente estables hasta temperaturas alrededor de 280 °C, y que esta estabilidad no depende del tiempo de almacenamiento.

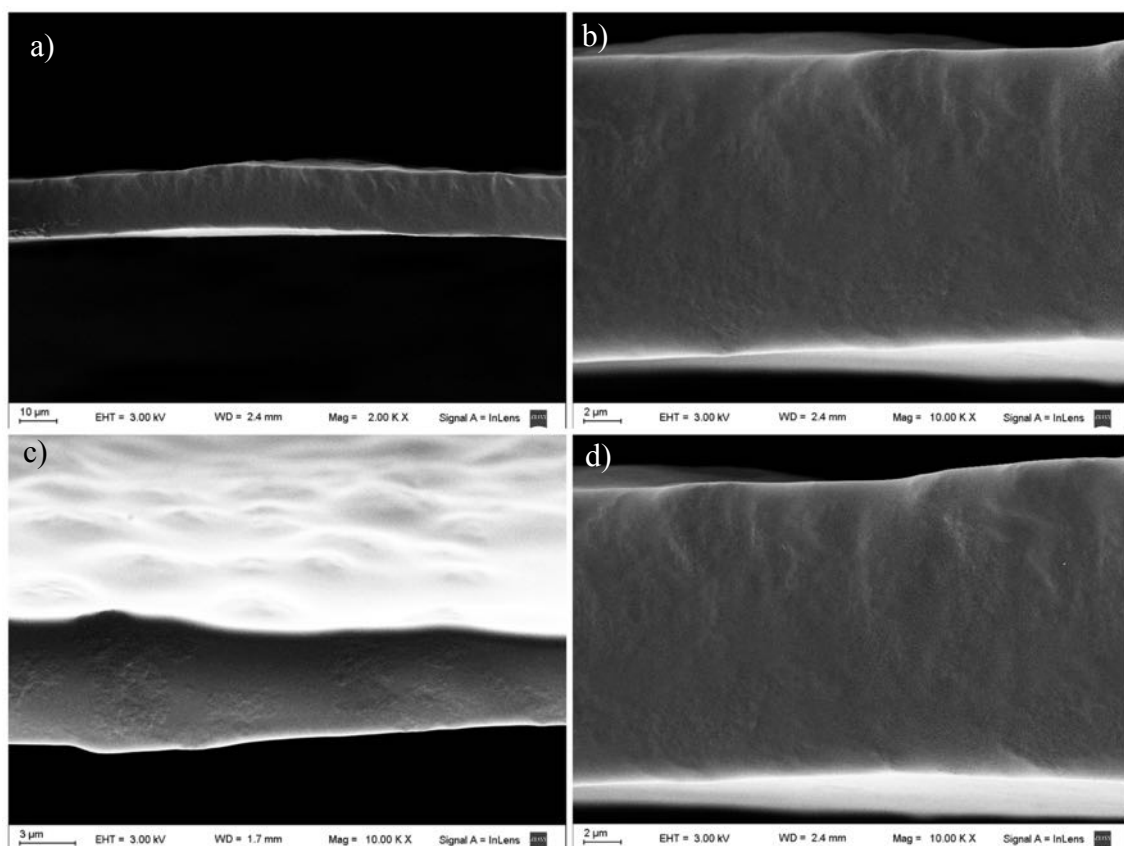
Las curvas DTA de las películas de almidón se muestran en la Figura 3.14. En ambas películas se pueden observar tres procesos endotérmicos. El primero, en el rango de temperatura de 50°C a 140°C, está asociado a la pérdida de agua y compuestos volátiles del almidón producto del calentamiento de las películas. Las otras dos caídas están relacionadas con la degradación del almidón. Resultados similares fueron reportados por Seligra et al., 2016) para almidones de mandioca. El proceso endotérmico del almidón se produjo en dos pasos consecutivos correspondientes a la descomposición térmica de la amilosa ( $T_{290 \sim 295}^{\circ}\text{C}$ ) y la amilopectina ( $T \sim 330^{\circ}\text{C}$ )



**Figura 3.14** Análisis termodiferencial de películas de almidón con diferentes tiempos de almacenamiento. (con 10 días de almacenamiento y envejecidas un año).

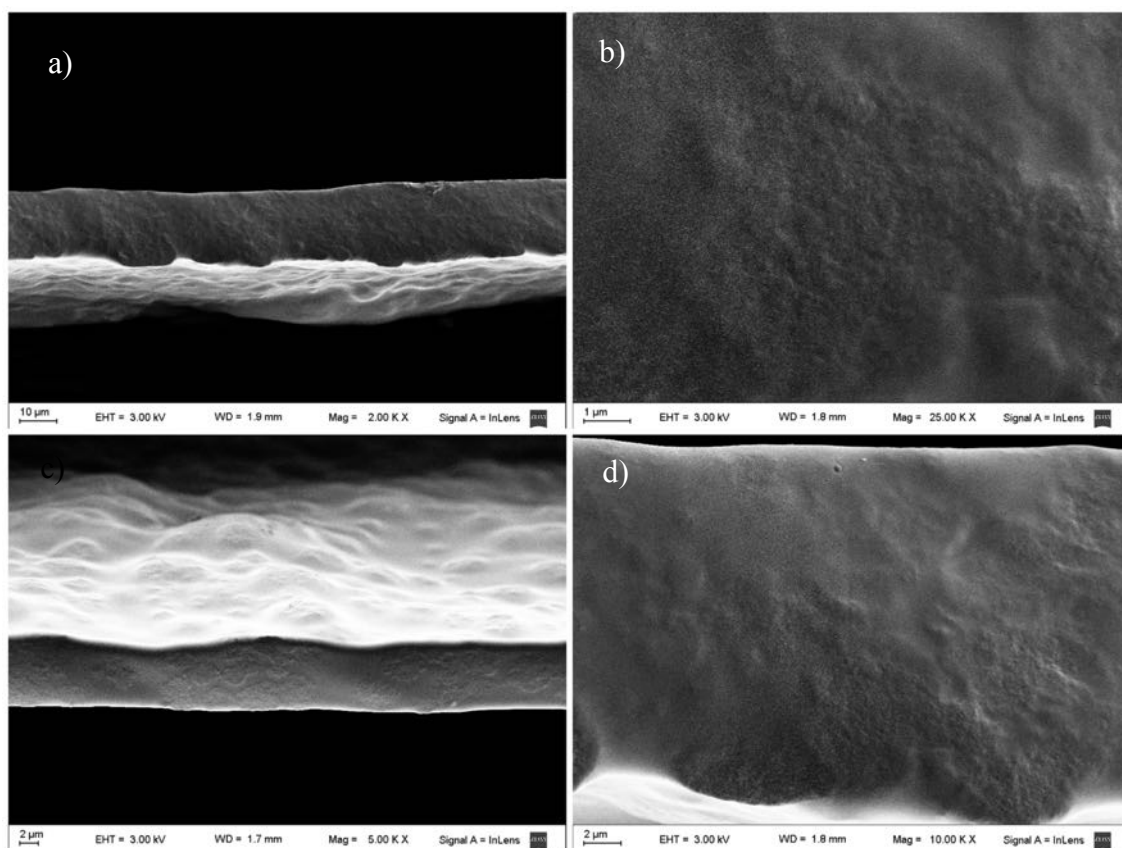
### Morfología de los films de almidón, amilosa y amilopectina

Las películas mostraron superficies rugosas y homogéneas sin poros, grietas, ni láminas y todas ellas fueron de espesores uniformes, observadas transversalmente. En la Figura 3.15. se pueden observar micrografías de películas de almidón.

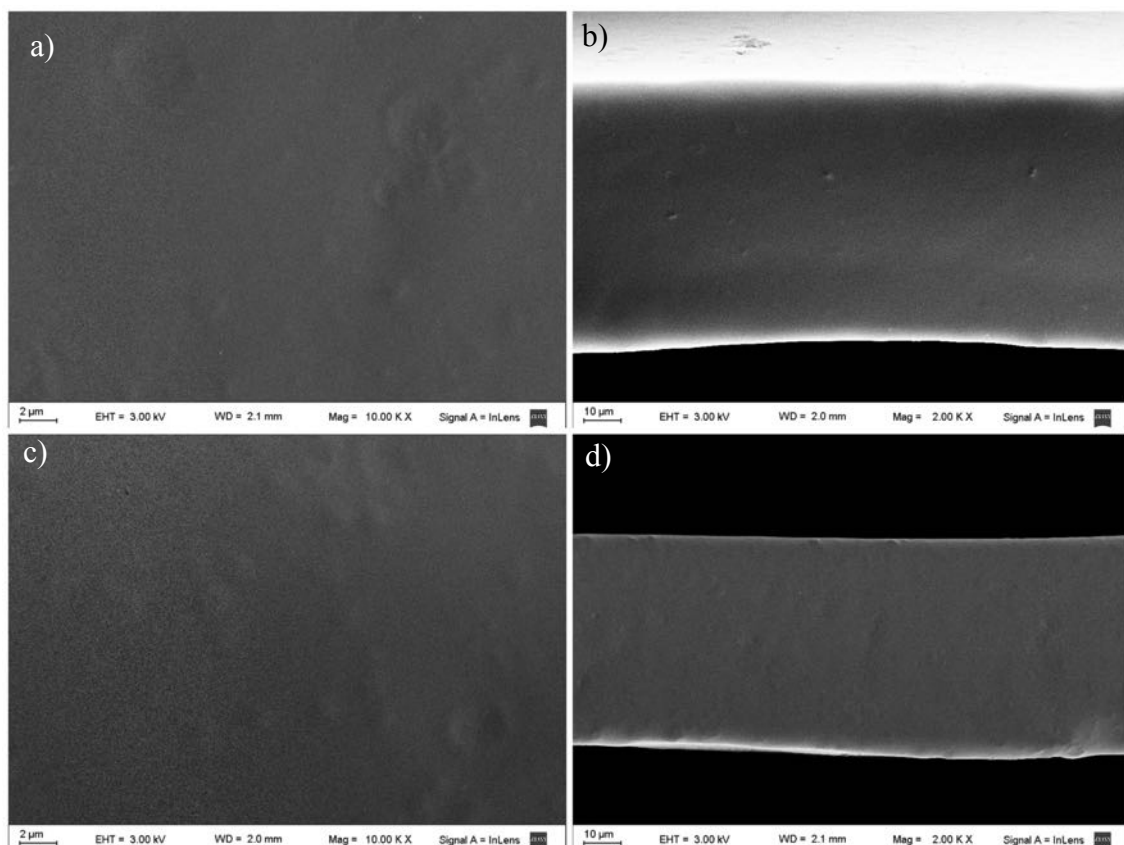


**Figura 3.15** Micrografías de películas de almidón nativo de mandioca. a) y b) películas con 10 días de almacenamiento c) y d) con un año de almacenamiento

En la Figura 3.16 se observan las micrografías de amilosa para los dos tiempos de almacenamiento estudiados en este trabajo. García et al., (2000), estudiaron películas de amilomaíz encontrando que las moléculas de amilosa sin el agregado de plastificantes externos produjeron películas frágiles, así como secciones transversales multilaminares. Las películas de amilosa obtenidas en este trabajo resultaron ser homogéneas sin superficies agrietadas ni porosas, pudiendo observarse además espesores uniformes en toda la sección fotografiada a diferencia de lo estudiado por García. Este comportamiento puede ser atribuido al método de obtención de las películas además de los espesores obtenidos y a la fuente botánica considerada.



**Figura 3.16** Micrografías de películas de amilosa de mandioca. A) y b) películas con 10 días de almacenamiento c) y d) con un año de almacenamiento



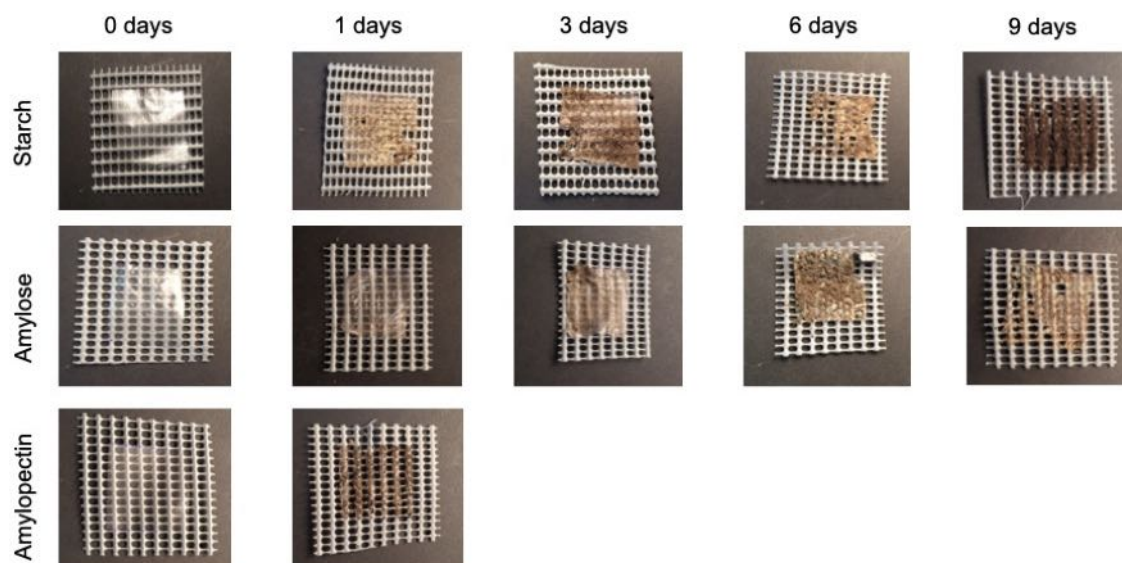
**Figura 3.17** Micrografías de películas de amilopectina de mandioca. A) y b) películas con 10 días de almacenamiento c) y d) con un año de almacenamiento

En cuanto a las películas de amilopectina (Figura 3.17) pudo observarse que tanto la superficie como la transversalidad muestran una homogeneidad exacerbada, perdiéndose la rugosidad característica de las películas de almidón o de amilosa, apreciándose zonas dúctiles y algunos “cráteres” característicos de la amilopectina.

### Ensayos cualitativos de Biodegradabilidad de Películas

Los ensayos de biodegradabilidad de películas fueron realizados tanto para películas nuevas como envejecidas, pero el efecto del envejecimiento no mostró diferencias significativas. Como puede observarse en la Figura 3.18, y en correlación con la alta solubilidad en agua, las películas de amilopectina son las que primero se degradan, finalizando el ensayo a las 12 h de iniciado el mismo.

Las películas que más tiempo tardaron en degradarse fueron las de amilosa, culminando el ensayo a los 12 días.

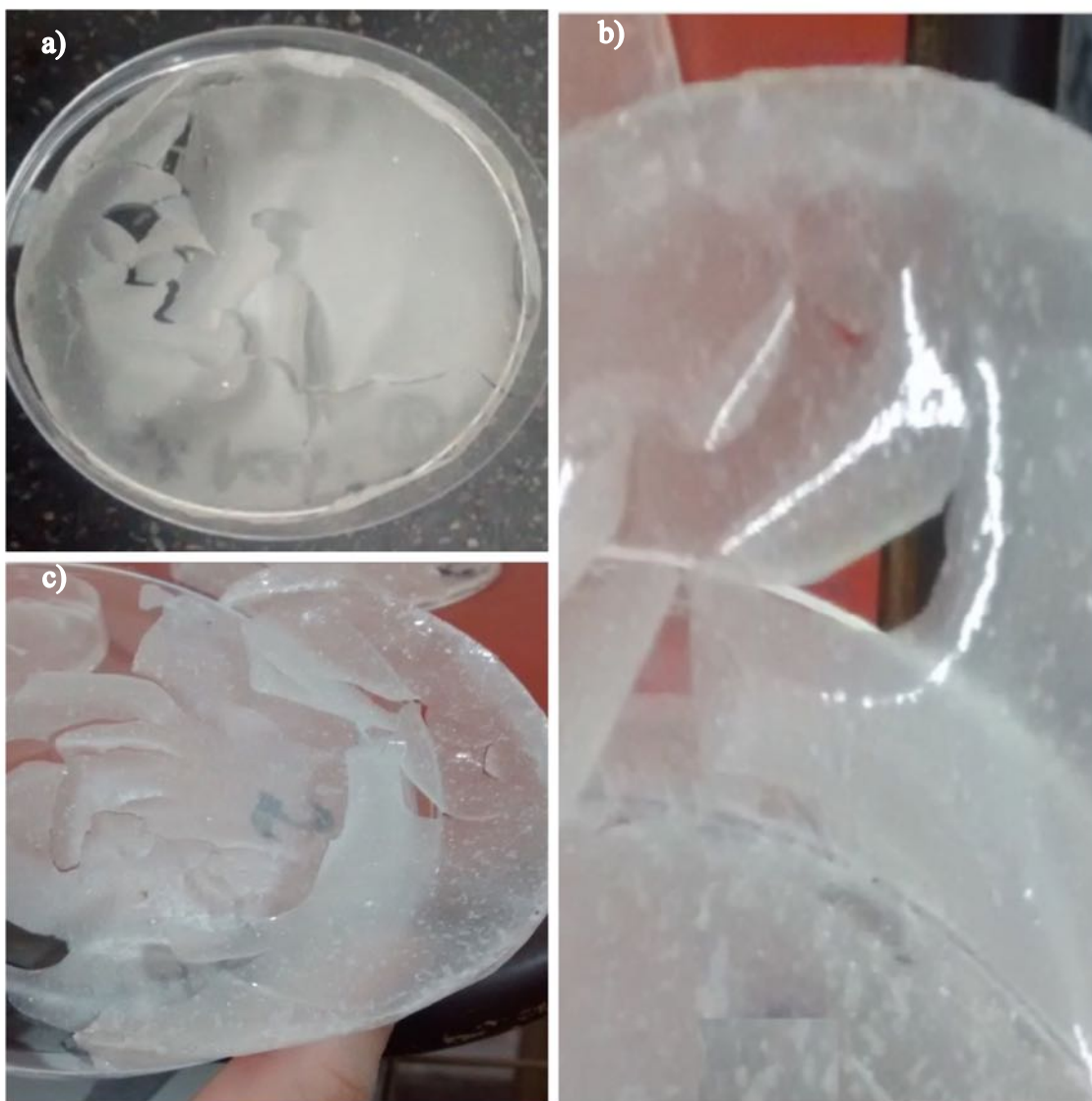


**Figura 3.18** Ensayos cualitativos de biodegradabilidad para películas con 10 días de almacenamiento



### **Películas de acetato de almidón de Mandioca (AAM) de alto grado de sustitución**

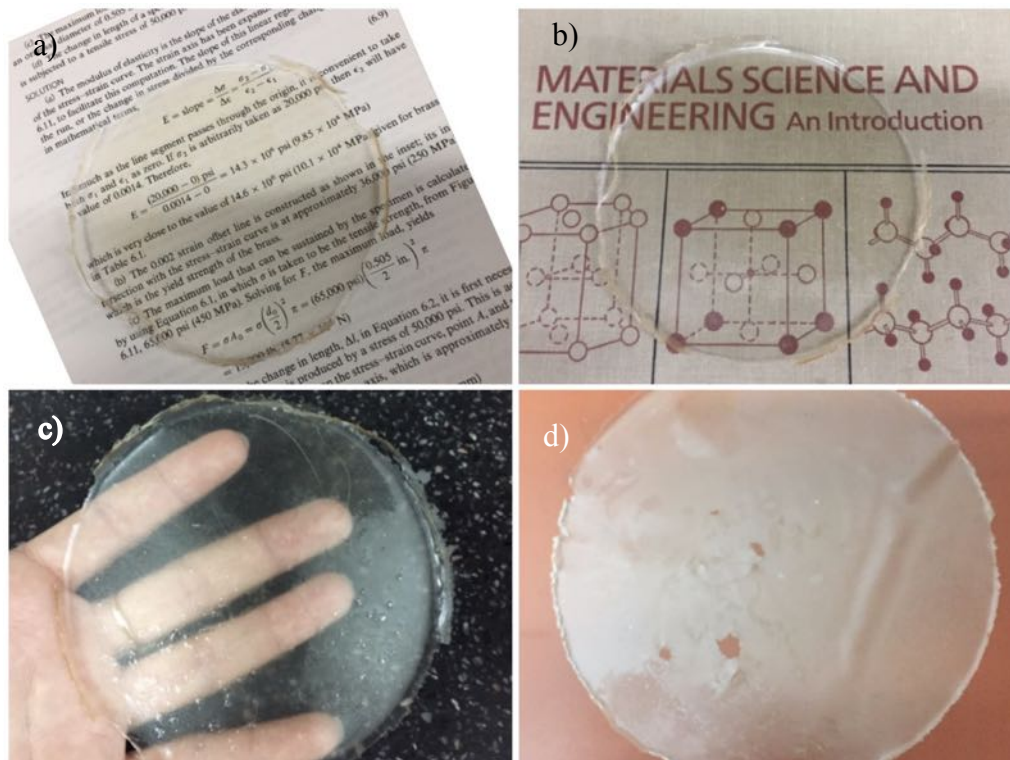
Las películas obtenidas a partir de soluciones de acetato de almidón de mandioca (DS 2,9) resultaron homogéneas y continuas con respecto a su contenido y espesor, de apariencia plástica, pero muy frágiles (Figuras 3.19 a, b y c). La Formulación de AAM en cloroformo al 5 % (p/v) + el plastificante (2-dodecen-1-il) anhídrido succínico (DSA) *al 50%* presentó las mejores propiedades filmogénicas.



**Figura 3.19** a) Películas de CSA DS: 2,9 al 5 % sin plastificante. b) y c) Películas de CSA al 5 % DS:2,9 con 20 % de plastificante al desmoldarla

El agregado de plastificante a las soluciones filmogénicas mejoró la apariencia y las propiedades mecánicas de los films obtenidos. Por otra parte, el hecho de que las

películas sean completamente translúcidas confirma la idea de que tanto el solvente como el plastificante fueron perfectamente compatibles en la matriz polimérica. Las películas de acetato de alto grado y 50% de DSA, mostraron excelentes propiedades al desmoldarlas (Figura 3.20 a, b y c), pero posterior a las dos semanas de almacenamiento, se volvieron cerosas producto de la segregación del plastificante hacia la superficie de las mismas (Figura 3.20 d), tornando a la película excesivamente quebradiza. Al ser el plastificante una molécula de alto peso molecular, de naturaleza mayormente apolar debido a su larga cadena hidrocarbonada, la asociación a las moléculas del polímero sería mayoritariamente, por fuerzas de Van der Waals y al encontrarse en altas concentraciones en la matriz polimérica, la afinidad química hace que las moléculas migren hacia regiones de menor energía libre, esto es hacia la superficie. Por otro lado, la hidrólisis del anhídrido succínico (extremo polar) afectaría el estado de agregación del plastificante favoreciendo la segregación del mismo. Otra razón para este fenómeno de migración hacia la superficie, es la diferencia de densidad entre los componentes.



**Figura 3.20** a), b) y c) Películas de AAM 5% DS 2,8 usando cloroformo como solvente y con 50 % de DSA, al desmoldarla. d) Película luego de dos semanas de almacenamiento



### Humedad

El contenido de humedad de las películas resultó afectado por la composición de las mismas, pero en general, tuvieron un porcentaje de humedad del 5 % para películas recién moldeadas y sin plastificante, y en el orden del 3-5 % para películas plastificadas con 50 % de DSA. Los bajos contenidos de humedad son producto de la composición hidrófoba de las películas.

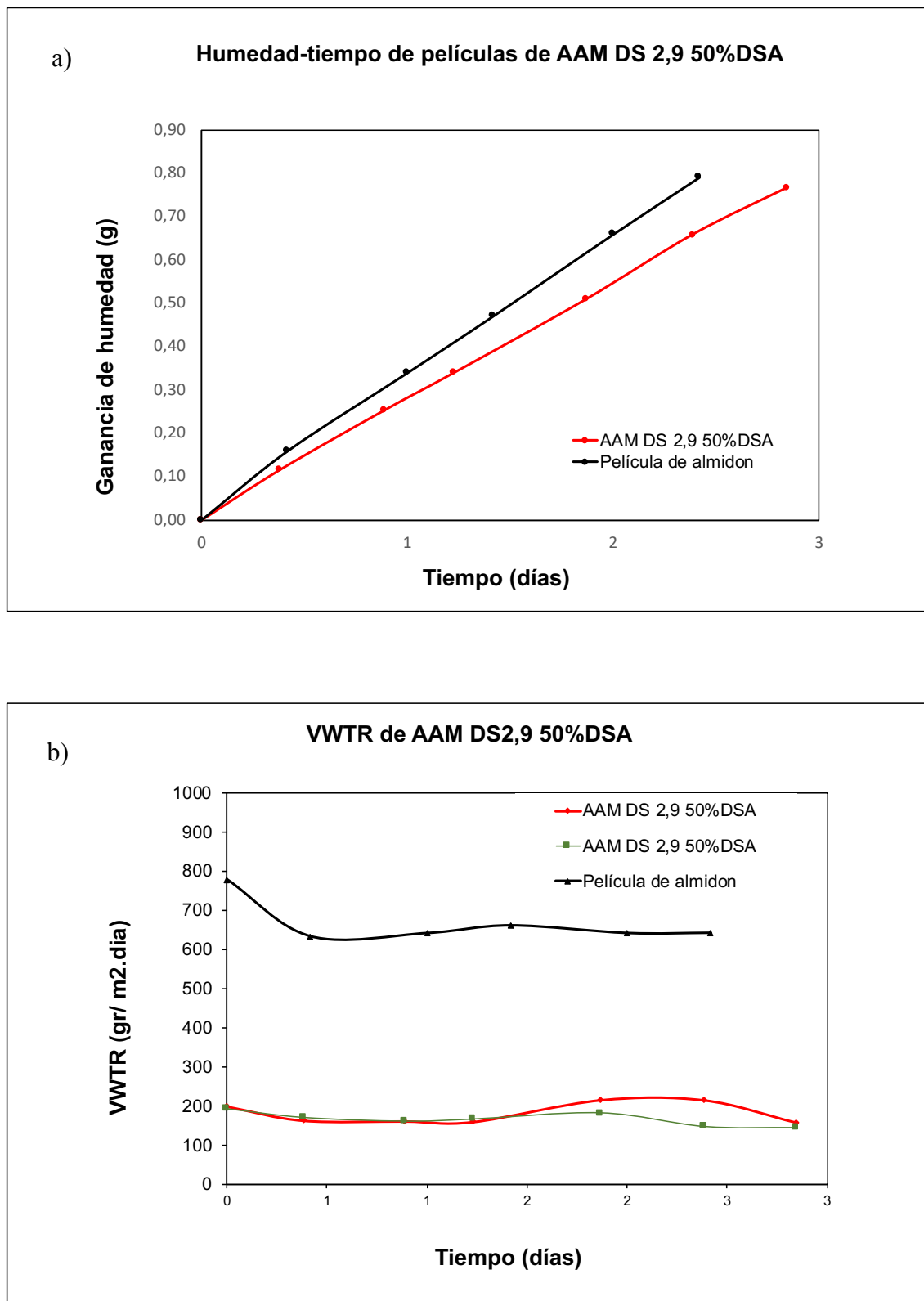
### Permeación al vapor de agua

En la Tabla 3.6 se presentan las propiedades de barrera al vapor de agua de la única formulación que resultó apta para el ensayo. Se encuentra una mejora significativa en las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas de AAM obtenidas en este trabajo con respecto a las películas de almidón nativo de mandioca reportados por Galdeano, Mali, Grossmann, Yamashita, & García, (2009), Muller M, (2009) y de almidón nativo maíz informados por Slavutsky & Bertuzzi, (2014). La baja permeabilidad medida podría atribuirse a la hidrofobicidad de la molécula de acetato de almidón, ya que los tres grupos acetato sustituyentes dotan de carácter apolar a las moléculas del polímero. Por otro lado, al utilizarse un plastificante de la misma naturaleza química, se mantiene el efecto de la hidrofobicidad del film, al tiempo que se evitan fenómenos de incompatibilidad que normalmente derivan en agrietamientos.

Tarvainen, Sutinen, Peltonen, Tiihonen, & Paronen (2002), reportan para almidones de papa con DS 2,8 con 50% de anhídrido octenil succínico (OSA) como plastificante, valores de permeabilidad de  $1,63 \cdot 10^{-10}$  g/msPa, semejantes que los obtenidos en el presente trabajo. En la figura 3.21 b. se exponen los promedios de velocidades de transmisión de agua para película de almidón nativo y almidón acetilado de alto grado de sustitución.

**Tabla 3.6.** Medidas de Permeabilidad, WVTR y espesores promedios para películas de AAM de alto grado de sustitución y plastificante.

<i>Material</i>	<i>WVTR</i>	<i>Error</i>	<i>Permeabilidad</i>	<i>Espesor</i>
	<i>g/m<sup>2</sup>s</i>	<i>Estándar</i>	<i>g/msPa</i>	<i>mm</i>
	<i>g/m<sup>2</sup>s</i>	<i>g/m<sup>2</sup>s</i>	<i>g/msPa</i>	<i>mm</i>
AAM 5% 50% DSA	$2,04 \cdot 10^{-03}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$1,29 \cdot 10^{-10}$	$1,50 \cdot 10^{-01}$



**Figura 3.21** a) Ganancia de humedad de películas de acetato de almidón de alto grado.  
b) grafica promedio de velocidades de transmisión de agua para película de almidón nativo y almidón acetilado de alto grado de sustitución

### Solubilidad

Las películas de almidón acetilados presentaron una menor solubilidad en agua tanto a 25°C como a 37 °C, estos resultados se atribuyen a la naturaleza hidrofóbica del grupo acetilo sustituyente. Además, esta tendencia se ve claramente favorecida por la naturaleza apolar del plastificante ya que al ser un succinil ácido de cadena larga, presenta un fuerte carácter hidrofóbico.

La solubilidad de las películas también se analizó en ácido clorhídrico (HCl 0,1 M) a 25 °C y 37 °C. Evaluar la digestividad de las películas a base de acetato de almidón proporcionó información útil en el caso de ingestión accidental que estén en contacto directo con alimentos. Se determinó la solubilidad de las películas en condiciones que reproducen el proceso de hidrólisis ácida. En los ensayos de simulación gástrica se observó que la solubilidad en este medio fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que, en medio acuoso, aun a la mayor temperatura ensayada.

**Tabla 3.7.** Solubilidad en agua a 25 y 37 C y en HCl 0.1M 25 y a 37 C de películas de acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución.

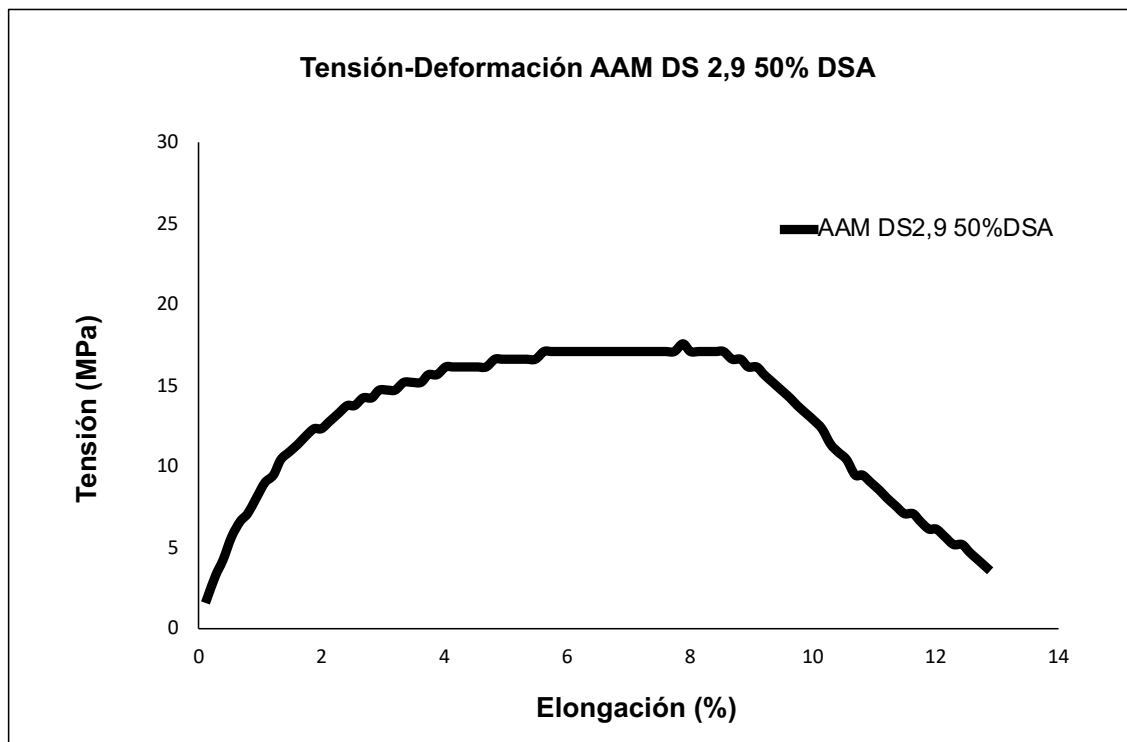
<i>Solubilidad de AAM 2,9 +50%DSA</i>	25 °C	37 °C
Medio acuoso	12±0,1% <sup>a</sup>	22,7±0,20% <sup>a</sup>
Medio ácido	16,3±0,02% <sup>b</sup>	31,7±0,25% <sup>b</sup>

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%.

### Propiedades Mecánicas

Las películas no plastificadas y con contenidos de DSA del 20% desarrolladas en este estudio fueron demasiado rígidas y frágiles, por lo que se requirió un contenido de plastificante del 50% para lograr películas aptas para las pruebas de tracción. La alta concentración de plastificante requerida para relajar las cadenas del polímero, podría deberse a la estructura molecular compleja del AAM y a su alto peso molecular. Tarvainen et al., (2002), detallan que la estructura compleja del acetato de almidón crea lugares de enlaces para cadenas de polímero adyacentes, lo que permite que se formen fuertes fuerzas cohesivas y estructuras tenaces y densas en los films. En la Figura 3.22 se presenta la curva característica tensión - deformación de películas de AAM con 50 % de DSA. Las propiedades mecánicas de estas películas, demuestran que el material es dúctil con valores de tensión de rotura promedio de 17,5 MPa y deformación de rotura

de 8%. Los valores máximos de tensión obtenidos en este estudio fueron significativamente mejores que los reportados por Tarvainen et al., (2003), (9,1 Mpa) para películas de acetato de almidón de papa con el mismo DS y el mismo plastificante.



**Figura 3.22** Diagrama Tensión - Elongación de películas de acetato de almidón de mandioca con grado de sustitución de 2,9 y 50% de DSA como plastificante

### **Selección de matrices viables a ser utilizadas como recubrimientos de quesos semiduros**

En la tabla 3.8 se muestra un breve resumen de las propiedades medidas mas relevantes de las distintas películas estudiadas, para un tiempo de almacenamiento de 10 días.

**Tabla 3.8** Resumen de principales propiedades de las películas estudiadas.

<i>Propiedad</i>	<i>Película</i>			
	Almidón	Amilosa	Amilopectina	Acetato de Almidón
Espesor promedio (mm)	0,03	0,03	0,06	0,15
Humedad (%)	11	12	10	3-5
Permeabilidad (g/msPa)	$6,63 \cdot 10^{-11}$	$8,21 \cdot 10^{-11}$	$8,11 \cdot 10^{-11}$	$1,29 \cdot 10^{-10}$
WVTR (g/m2s)	$7,88 \cdot 10^{-03}$	$6,97 \cdot 10^{-03}$	$4,20 \cdot 10^{-03}$	$2,04 \cdot 10^{-03}$
Solubilidad en agua a 25 °C (%)	22,2	0	100	12
Solubilidad en ácido a 37 °C (%)	40,4	9	100	31
Tensión de rotura (MPa)	31,9	27	34	17,5
Elongación (%)	2,26	3,22	2,4	8
Cristalinidad (%)	3	5	2	--
Degradación Térmica (°C)	280-340	280-340	280-340	--
Biodegradabilidad en suelo (días)	9	12	2	--

Para las experiencias de preservación de quesos, se seleccionaron para ensayar como recubrimiento las películas de almidón y amilosa, ya que presentaron buenas propiedades mecánicas, adecuada solubilidad en agua y su estabilidad en el tiempo fue adecuada aun conteniendo bajas concentraciones de polímero.

Las películas de amilopectina, presentaron buenas propiedades en general aún en muy bajas concentraciones de polímero, pero su alta solubilidad en agua condiciona su aplicación como recubrimiento, en los quesos seleccionados en este trabajo.

Las películas de Acetato de almidón de alto grado, presentaron buenas propiedades mecánicas y de solubilidad en agua, pero la necesidad de incorporar un plastificante en altas concentraciones fue determinante en la estabilidad de las películas, limitando su aplicación como recubrimiento. Otra condicionante, resultó de la necesidad de solubilizarlo en solventes apolares orgánicos, limitando su aplicación por inmersión.

## CONCLUSIONES

---

Fue posible obtener películas dúctiles de espesor homogéneo y buenas propiedades mecánicas de almidón de mandioca en concentraciones por debajo el 1%, utilizando solamente agua como plastificante externo, mediante gelatinización a alta temperatura (120 °C).

Mediante una modificación del Método de Mukerjea, se logró la separación de amilosa y amilopectina de mandioca y el desarrollo de películas de ambas fracciones con buenas propiedades mecánicas y utilizando solamente agua como plastificante. Las películas de amilosa resultaron insolubles en agua a temperatura ambiente, mientras que las de amilopectina se disolvieron rápidamente para las condiciones del ensayo.

Los difractogramas de rayos X mostraron que todas las películas desarrolladas resultaron amorfas, observándose pocos picos cristalinos y de baja intensidad, manteniéndose esta tendencia no solo en los materiales recién moldeados sino también en aquellas películas que fueron almacenadas. El patrón de difracción en todos los casos fue de tipo A. Los picos en el espectro infrarrojo asociados a la cristalinidad se encuentran ausentes para todas las películas de almidón y sus fracciones.

Se ha conseguido retrasar de manera significativa la retrogradación de los films de almidón y sus fracciones. El tratamiento térmico utilizado para gelatinización del almidón, está directamente involucrado en la destrucción completa de la estructura cristalina, produciendo el efecto antes mencionado, junto con los bajos contenidos de humedad que presentan los films.

Las películas de almidón de mandioca acetilado resultaron homogéneas y continuas, de apariencia plástica, pero muy frágiles. El agregado 50% de DSA permitió obtener películas con buenas propiedades mecánicas (tensión de rotura 17,5 MPa, deformación 8%) pero que con el almacenamiento, se volvieron cerosas y frágiles impidiendo su utilización como recubrimientos de quesos semiduros.

Las matrices poliméricas, cuyas propiedades resultaron adecuadas para su utilización como recubrimientos de los quesos ensayados en este trabajo, fueron almidón y amilosa de mandioca.

**ABREVIATURAS:**

---

AAM: acetato de almidón de Mandioca

OSA: anhídrido octenil succínico

DSA:(2-dodecen-1-il) anhídrido succínico'

HR: humedad relativa

Casting: moldeo

ATR: Reflexión total atenuada

ASTM: American Society for Testing and Materials

**Términos en ingles:**

WVTR: water vapor transmition rate.

Coating: recubrimiento

Film: película

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Alves, V. D., Mali, S., Beléia, A., & Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 941–946. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.007>
- Bader, H. G., & Göritz, D. (1994). Investigations on High Amylose Corn Starch Films. Part 3: Stress Strain Behaviour. *Starch - Stärke*, 46(11), 435–439. <https://doi.org/10.1002/star.19940461106>
- Bertuzzi, M. A., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.016>
- Bertuzzi, Maria Alejandra, Gottifredi, J. C., & Armada, M. (2012). Mechanical properties of a high amylose content corn starch based film, gelatinized at low temperature. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(3), 219–227. <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012005000015>
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.024>
- Fringant, C., Rinaudo, M., Gontard, N., Guilbert, S., & Derradji, H. (1998). A Biodegradable Starch Based Coating to Waterproof Hydrophilic Materials. *Starch - Stärke*, 50(7), 292–296. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-379x\(199807\)50:7<292::aid-star292>3.3.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-379x(199807)50:7<292::aid-star292>3.3.co;2-r)
- Galdeano, M. C., Mali, S., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & García, M. A. (2009). Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.034>
- García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2000). Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch/Stärke*. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200006\)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200006)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO;2-0)
- Goodfellow, B. J., & Wilson, R. H. (1990). A fourier transform IR study of the gelation of amylose and amylopectin. *Biopolymers*. <https://doi.org/10.1002/bip.360301304>



- Guan, J., & Hanna, M. A. (2004). Extruding foams from corn starch acetate and native corn starch. *Biomacromolecules*. <https://doi.org/10.1021/bm049512m>
- Gunaratne, A., & Hoover, R. (2002). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00354-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00354-X)
- Imberty, A., & Perez, S. (1988). A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers*. <https://doi.org/10.1002/bip.360270803>
- Jiang, X., Li, H., Luo, Y., Zhao, Y., & Hou, L. (2016). Studies of the plasticizing effect of different hydrophilic inorganic salts on starch/poly (vinyl alcohol) films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82(3), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.046>
- Johnston, D. A., Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2011). Preparation and characterization of new and improved soluble-starches, -amylose, and -amylopectin by reaction with benzaldehyde/zinc chloride. *Carbohydrate Research*, 346(17), 2777–2784. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.003>
- Liu, Z. (2005). Edible films and coatings from starches. In *Innovations in Food Packaging*. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50051-6>
- López, O. V., García, M. A., & Zaritzky, N. E. (2008). Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.023>
- Lourdin, D., Coignard, L., Bizot, H., & Colonna, P. (1997). Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymer*. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00082-7)
- Lourdin, Denis, Valle, G. Della, & Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00071-2)
- Methods, C. (2003). *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Shipping Containers* —. <https://doi.org/10.1520/D4279-95R09.2>
- Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2010). Isolation, structure, and characterization of the

- putative soluble amyloses from potato, wheat, and rice starches. *Carbohydrate Research*, 345(3), 449–451. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.11.021>
- Muller M, L. J. Y. (2009). Muller cellulose reinforced starch .pdf. *Food Hydrocolloids*, 23, 1328–1333.
- Myllärinen Päivi, Partanen Riitta, Seppälä Jukka, & Forssell Pirkko. (2002). Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00042-5)
- Protzman, T. Wagoner, J. (1964). |*Gelatinized starch products*.
- Rindlav, Å., Hulleman, S. H. D., & Gatenholm, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/s0144-8617\(97\)00093-3](https://doi.org/10.1016/s0144-8617(97)00093-3)
- Robertson, G. L. (2013). Food Packaging: Principles and Practice, Third Edition. In *Taylor & Francis Group*.
- Sarko, A., & Wu, H. -C H. (1978). The Crystal Structures of A-, B- and C-Polymorphs of Amylose and Starch. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19780300302>
- Seligra, P. G., Medina Jaramillo, C., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.041>
- Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2014). Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, 110, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.049>
- Tarvainen, M., Sutinen, R., Peltonen, S., Mikkonen, H., Maunus, J., Vähä-Heikkilä, K., ... Paronen, P. (2003). Enhanced film-forming properties for ethyl cellulose and starch acetate using n-alkenyl succinic anhydrides as novel plasticizers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(5), 363–371. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00137-4)
- Tarvainen, M., Sutinen, R., Peltonen, S., Tiihonen, P., & Paronen, P. (2002). Starch acetate - A novel film-forming polymer for pharmaceutical coatings. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(1), 282–289. <https://doi.org/10.1002/jps.10027>

- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*.  
[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Van Soest, J. J. G., Hullemann, S. H. D., De Wit, D., & Vliegenthart, J. F. G. (1996). Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*.  
[https://doi.org/10.1016/0926-6690\(95\)00048-8](https://doi.org/10.1016/0926-6690(95)00048-8)
- Warren, F. J., Gidley, M. J., & Flanagan, B. M. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure - A joint FTIR-ATR, NMR, DRX and DSC study. *Carbohydrate Polymers*, 139, 35–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.066>
- Wilson, R. H., & Belton, P. S. (1988). A Fourier-transform infrared study of wheat starch gels. *Carbohydrate Research*, 180(2), 339–344.  
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80090-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80090-9)
- Wolff, I. A., Davis, H. A., Cluskey, J. E., Gundrum, L. J., & Rist, C. E. (1951). Preparation of Films from Amylose. *Industrial & Engineering Chemistry*, 43(4), 915–919. <https://doi.org/10.1021/ie50496a039>
- Xu, Y., Miladinov, V., & Hanna, M. A. (2004). This article is from the November-December 2004 issue of published by the American Association of Cereal Chemists, Inc. Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution 1. *Cereal Chemistry*, 81(December), 735–740.
- Zavareze, E. da R., & Dias, A. R. G. (2011). Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 317–328.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.08.064>

## *CAPÍTULO 4*

### *Formulación de recubrimientos activos y su efecto sobre la conservación de quesos regionales*

---

## INTRODUCCIÓN

---

La fabricación de queso es una de las tecnologías más antiguas empleadas para concentrar nutrientes y preservar el alimento para un consumo más prolongado. Su empleo ha ido en constante crecimiento y en 2017, la producción mundial de queso ascendió a 22.000 toneladas. Actualmente se producen más de 1000 variedades de queso en todo el mundo, y cada una tiene una forma, tamaño, sabor y textura únicas (International Dairy Federation (2017)).

La provincia de Misiones actualmente es una región incipiente en la industria láctea, con una cuenca lechera que cuenta con 272 productores lecheros registrados, con un rodeo aproximado de 3.000 vacas y con un acopio promedio total de 6.830.000 litros de leche por año. Los productores realizan distintas variedades, como ser: quesos cuartirolo, barra, Holanda, cremoso, ricota y dulce de leche. Para la producción de 1 kilo de queso se necesitan 8 litros de leche, por lo que se podría obtener una producción anual de 675.000 kilos de queso.

Con el excedente de la producción de leche se elaboran otros productos como ser: ricota y dulce de leche. Según reportes del Ministerio Provincial del Agro y la Producción, las principales cooperativas productoras están emplazadas en la zona del Alto Uruguay y son: Cooperativa Agropecuaria Las Mercedes (San Vicente); Cooperativa Agropecuaria Sarandí Limitada (El Soberbio); Cooperativa Agropecuaria y Forestal Tambera Esperanza Km 7; Cooperativa Alto Uruguay de Electricidad y otros Servicios Públicos Limitada CAUL; Cooperativa Agroindustrial Tambera Aurora Limitada (Colonia Aurora); Cooperativa Agropecuaria para Pequeños Productores San Jorge Limitada; Cooperativa Agropecuaria El Polvorín Limitada (San Pedro) y Cooperativa Avícola Tres Marías Limitada (San Antonio) entre otras. Esto exige un compromiso en el desarrollo tecnológico a fines de lograr que los productos generados en la región alcancen un mayor nivel de industrialización y puedan ser competitivos en calidad y cantidad.

Cubrir el queso con una película o recubrimiento permite controlar la sequedad de la superficie, la humedad y pérdida de peso durante la maduración, permitiendo además que los quesos maduren internamente con la microflora propia, lográndose un mejor control del proceso. Durante el almacenamiento el recubrimiento de los quesos extiende la vida útil del producto. También la selección de envases y recubrimientos de los

quesos juega un factor importante en la determinación de la preferencia del consumidor por el producto (Youssef, Assem, El-Sayed, Salama, & Abd El-Salam, 2017).

El uso de recubrimientos tradicionales (no biodegradables) y materiales no renovables, como las películas plásticas, representan un serio problema de contaminación del ambiente. Debido a esto, en los últimos años, un número importante de investigaciones se han direccionado al desarrollo de materiales de envase amigables con el medio ambiente.

Existen múltiples maneras de clasificar los quesos. Una de las más simples es la clasificación basada en el contenido de humedad, donde las categorías son: duro (41-56 %), semiduro (54-63 %) y blando (61-70 %).

Para mejorar las propiedades de conservación de quesos se han utilizado muchos de los agentes antimicrobianos normalmente empleados en la industria alimenticia, ya sea con aplicación directa sobre el alimento o incorporados a recubrimientos y películas de envase. Según cómo estos materiales exhiben sus actividades, se clasifican en dos categorías, la primera categoría la constituyen aquellos que pueden exhibir su acción migrando en baja concentración al alimento y la segunda, comprende aquellas sustancias que previenen el crecimiento microbiano en la superficie de los alimentos sin migración significativa del conservante.

Ácidos orgánicos y sus sales como sorbatos, benzoatos y propionatos se han utilizado en la conservación de quesos. Las bacteriocinas son agentes antimicrobianos producidos por bacterias. Nisina y natamicina son dos bacteriocidas producidos comercialmente y utilizadas en la preparación de recubrimientos y películas activas. La natamicina ha sido probada y aprobada como un conservante de alimentos adecuado para el consumo humano, entre otros, por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Food and Drug Administration (FDA), y el Código Alimentario Argentino (CODA).

Como antifúngico, puede extender significativamente la vida útil de muchos productos, como ser quesos y carne curada. Estas categorías de alimentos necesitan de la conservación contra los hongos y levaduras, pero necesitan permitir que los cultivos, es decir las bacterias, permanezcan activos.

En cuanto a la aplicación de los recubrimientos, se han estudiado varias formas, entre ellas, la inmersión es la forma más común a escala de laboratorio, en el recubrimiento de quesos debido a su simplicidad, bajo costo y buena cobertura en alimentos de

superficie irregular. Sin embargo, el método puede conducir a la dilución de la solución de recubrimiento. En el recubrimiento por “brushing”, la solución se aplica sobre las superficies del queso usando un pincel o cepillo, este método es adecuado para escala de laboratorio y producción de queso a pequeña escala. En la tecnología “envolvente” la solución de recubrimiento fluye verticalmente a los alimentos tratados. Para obtener una cobertura de buena calidad del producto (una capa uniforme y peso exacto), la viscosidad de la solución es un parámetro clave, pues se debe mantener la preponderancia de las fuerzas viscosas y gravitacionales. El recubrimiento por “spray” es un método ampliamente utilizado para aplicar recubrimientos, ofreciendo un revestimiento uniforme, con control de espesor y la posibilidad de aplicaciones sucesivas sin contaminar la solución de recubrimiento (Andrade RD, Olivier S, Osorio FA (2012)). La pulverización electrostática tiene la ventaja que, controlando el tamaño de la gota, el área de cobertura y la velocidad de deposición, se puede lograr una distribución homogénea y reducir el desperdicio.

Numerosos investigadores han ensayado recubrimientos biopoliméricos para extender la vida útil de quesos. Zhong, Cavender, & Zhao (2014), investigaron tres materiales de recubrimiento diferentes (quitosano, alginato de sodio y proteína de soja) y cuatro métodos de aplicación del recubrimiento (inmersión, envoltura, pulverización y pulverización electrostática) para recubrir queso Mozzarella. Se evaluaron cambios en la morfología y la calidad del queso durante el almacenamiento a 4 °C. El queso recubierto de alginato de sodio presentó las mejores propiedades fisicoquímicas generales en el almacenamiento, mientras que los efectos de conservación no fueron significativamente diferentes entre los cuatro métodos de recubrimiento. Di Pierro, Sorrentino, Mariniello, Giosafatto & Porta (2011), envasaron queso ricotta utilizando un recubrimiento comestible de quitosano y proteína de suero y lo almacenaron en atmósfera modificada a 4 °C por 30 días. Los valores medidos de microorganismos bacterianos, mesofílicos y psicrotróficos fueron mucho más bajos en el queso recubierto de quitosano / suero, en comparación con el control, en cada tiempo de almacenamiento.

Cerqueira et al., (2010) estudiaron queso semiduro (regional) recubiertos con soluciones de quitosano (0,5% de quitosano, 2% de glicerol / sorbitol) y galactomanano (1,5% de galactomanano, 2,0% de glicerol y 0,5% de aceite de maíz) almacenados a temperaturas de 4 y 20 °C. El queso recubierto con galactomanano mostró la mayor disminución en el intercambio de gases, mientras que la disminución del contenido de humedad fue 2.5

y 1.9% y las pérdidas de peso 3.8 y 3.1% respectivamente. Además, el recubrimiento disminuyó la dureza del queso y produjo cambios de color. Fajardo, Martins, Pastrana, Texeira & Vicente .,(2010) estudiaron el efecto de la aplicación de recubrimientos de quitosano con el agregado de natamicina, sobre las propiedades fisicoquímicas y microbianas de queso Saloio (semi duro). Los análisis microbiológicos mostraron que las muestras recubiertas con natamicina presentaron una disminución en mohos y levaduras en comparación con el control después de 27 días de almacenamiento, contribuyendo así a extender su vida útil. Lucera, Mastromateo, Conte, Zambrini & Faccia, (2014) investigaron la efectividad de recubrimientos de alginato de sodio (2%) con el agregado de sorbato de potasio , benzoato de sodio , lactato de calcio y ascorbato de calcio (1%, 2%, 3%, p / v), sobre la microbiología y la pérdida de calidad sensorial del queso mozzarella. El recubrimiento con sorbato de potasio al (3%) mostró un efecto inhibidor sobre la microflora del queso y duplicó la vida útil del queso Mozzarella en comparación con el no recubierto. Pocos trabajos estudiaron al almidón y en particular al almidón de mandioca en la generación de recubrimientos, Olle Resa, Gerchenson & Jagus, (2014), y (2016) , investigaron el uso de films de almidón de tapioca conteniendo glicerol como plastificante, con natamicina como antimicrobiano, en el control de hongos y levaduras en queso portsalud. Ellos encontraron que, además de la inhibición de *S. Cerevisiae*, la aplicación del recubrimiento en forma de film, resultó en ventaja por sobre la aplicación en spray. Los mismos autores en (2016) investigaron el uso de films de almidón de tapioca con natamicina y nicina en la proliferación de microorganismos en queso portsalud, encontrando buenos resultados en la inhibición de hongos y levaduras y en el control del crecimiento de bacterias psicrótróficas. En función de lo antes descripto, el objetivo del presente capítulo fue ensayar las matrices poliméricas seleccionadas aplicadas como recubrimientos y evaluar el efecto de las mismas, en la extensión de la vida útil de quesos de pasta semiduras de fabricación regional.

Para la elección de las matrices poliméricas a ensayar como recubrimientos, se tuvieron en cuenta criterios como ser: propiedades de barrera, propiedades mecánicas, solubilidad y sobre todo se evaluó el efecto del almacenamiento en las películas; todas estas propiedades fueron medidas en el capítulo 3. La aplicación del recubrimiento en el queso no garantiza que este tendrá las mismas propiedades que las películas obtenidas por casting, sin embargo, estas propiedades pueden ser representativas del



comportamiento de la película y deben considerarse a fines de obtener una adecuada afinidad entre el recubrimiento y el alimento. La efectividad del recubrimiento puede ser evaluado por:

- 1) La disminución de la pérdida de agua del queso.
- 2) El cambio en la permeabilidad a los gases y vapores.
- 3) El incremento de la vida útil por retraso de la proliferación de bacterias, hongos y levaduras.
- 4) Apropriadas propiedades mecánicas: estas pueden resultar útiles en la protección del queso, mejorando la integridad del alimento.

En función de estos criterios se decidió ensayar recubrimientos a base de almidón nativo de mandioca y de amilosa de mandioca, obtenidas y gelatinizadas según la metodología descrita en el capítulo 3. Las formas de aplicación de los recubrimientos fueron inmersión y envoltorio en película, siendo esta última opción la seleccionada para el estudio de la vida útil a partir de los análisis microbiológicos. El antimicrobiano seleccionado fue natamicina y el queso seleccionado para llevar a cabo el estudio fue queso regional (barra), clasificado como un queso de pasta semidura, de mediana humedad, producido por la Cooperativa Alto Uruguay Limitada (CAUL), en 25 de Mayo, Misiones.

El objetivo del presente capítulo es evaluar el efecto de las matrices poliméricas seleccionadas aplicadas como recubrimientos activos, en la extensión de la vida útil de quesos de pasta semiduras de fabricación regional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Materiales

Almidón de mandioca comercial fue proporcionado por Aldema®, el queso regional de tipo barra, fue adquirido a Cooperativa Alto Uruguay Limitada (CAUL) (25 de Mayo, Misiones) y el agua fue agua ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU.). El n-butanol fue de calidad analítica comprado a Cicarelli®, Reagent SA. Natamicina al 50% en NaCl fue adquirido a BIOTEC S.A. Agar PCA, HyL y agua peptonada fueron adquiridos a Britania S.A.

## Preparación de los recubrimientos

Los recubrimientos fueron preparados siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3, para cada matriz polimérica. Para el caso de los recubrimientos con natamicina, una vez gelatinizado el almidón (para el caso del almidón), y una vez destilada la amilosa (caso de amilosa) dos concentraciones distintas de natamicina fueron incorporadas mediante agitación vigorosa de 600 rpm. Estas soluciones fueron empleadas, para el caso de aplicación por inmersión. Para el caso de la obtención de películas (envoltorio con películas) las soluciones fueron moldeadas en TEFLON®. Se estudiaron dos concentraciones de natamicina, la primera, es la fijada como máxima por el Código Alimentario Argentino para este antimicrobiano (1mg/dm<sup>2</sup> de superficie de queso) y la segunda concentración, fue seleccionada en función de la literatura (10 mg/dm<sup>2</sup>).

### Cálculo de las concentraciones de Natamicina

La cantidad de natamicina fue calculada en la solución filmogénica en mg/mL y la solución depositada en mg/dm<sup>2</sup> usando la siguiente ecuación:

$$\text{Natamicina en el recubrimiento}(\text{Peso} \mid \text{Superficie}) = \text{concentracion de natamicina}(\text{Peso} \mid \text{Volumen}) \times \text{solución depositada}(\text{Volumen} \mid \text{Superficie})$$

(4.1)

## Formas de aplicación de los recubrimientos

### Inmersión

Cubos de quesos de 2,5x2,5x0,5 cm fueron inmersos por 3 minutos en las distintas soluciones de recubrimientos, permitiendo, luego, el drenado del “coating” residual. Los quesos fueron dejados 24 h a 4 °C en 35% HR, a fines de secar el recubrimiento.

### Envoltorio en película auto soportada

Cubos de quesos de 2,5x2,5x0,5 cm fueron recubiertos en toda su superficie por películas de almidón y amilosa sin antimicrobiano (control) y con dos concentraciones de natamicina.

### Diseño experimental

Para la evaluación de pérdida de Peso y humedad, así como para la evaluación de influencia de la temperatura en el desarrollo de microorganismos, se siguió el diseño de la tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Diseño de experimental para ensayos de pérdida de peso y humedad e influencia de la temperatura en el desarrollo de microorganismos.

<i>Polímero</i>	<i>Forma de aplicación</i>	<i>Concentración de Natamicina</i>
Almidón	Envoltorio	1 mg/dm <sup>2</sup>
Amilosa	Envoltorio	10 mg/dm <sup>2</sup>
Amilosa	Envoltorio	1 mg/dm <sup>2</sup>
Amilosa	Inmersión	1 mg/dm <sup>2</sup>
Almidón	Inmersión	1 mg/dm <sup>2</sup>
Amilosa	Inmersión	10 mg/dm <sup>2</sup>
Almidón	Inmersión	10 mg/dm <sup>2</sup>
Almidón	Envoltorio	10 mg/dm <sup>2</sup>

Las piezas de queso recubiertas con almidón y amilosa sin natamicina y las piezas que no estaban recubiertas se usaron como control. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Humedad

La humedad se determinó midiendo la pérdida de peso de cubos de queso de 2,5 x 2,5 x 0,5 siguiendo el diseño de la tabla 4.1. Las muestras fueron secadas en una estufa a 105 °C hasta peso constante. Los ensayos se realizaron por duplicado a tiempos: 0 y 30 días de almacenamiento y los resultados fueron expresados en porcentaje (%).

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \quad (4.2)$$

### Pérdida de peso

Se determinó midiendo la pérdida de peso de cubos de queso de 2,5 x 2,5 x 0,5 siguiendo el diseño experimental de la tabla 4.1, luego de ser almacenadas refrigeradas

a 4 °C en 35, 75 y 92% de HR. Las muestras se analizaron por duplicado, a tiempos: 0; 3; 6; 9; 12 y 15 días. La pérdida de masa fue informada con una precisión de 0,001 g.

$$\Delta w = \frac{w_o - w_i}{w_o} * 100 \quad (4.3)$$

Donde  $w_o$  es el peso inicial de la muestra y  $w_i$  es el peso de la muestra al tiempo  $i$ .

### **Efecto de la temperatura y humedad relativa de almacenamiento en el desarrollo de microorganismos: ensayo de evaluación macroscópica**

La corteza del queso se eliminó con un cuchillo estéril a aproximadamente 5 mm de profundidad para eliminar el efecto de algunas grietas ya presentes en la superficie del queso, luego se cortaron piezas de 2,5 x 2,5 x 0,5 cm. Se prepararon soluciones de recubrimiento y películas con diferentes concentraciones de natamicina (1mg/dm<sup>2</sup>–10 mg/ dm<sup>2</sup>). Luego, los trozos de queso se recubrieron adecuadamente. La opción fue no inocular la superficie del queso sino dejar las muestras sujetas a la contaminación ocasional de la atmósfera circundante. Todos los quesos se incubaron 7 días a 25 ° C y 50 % HR y 20 días a 4 °C con 92 % HR. Las piezas de queso recubiertas con almidón y amilosa sin natamicina y las piezas sin recubrir se usaron como control. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### **Ensayos microbiológicos: recuento total de bacterias, hongos y levaduras**

Los cambios en las bacterias psicrotróficas y las levaduras y mohos totales, grupos microbianos que comúnmente causan deterioro en el queso, se midieron durante el almacenamiento. Para ello, los cubos de quesos recubiertos con “films” de almidón y amilosa, preparados en las condiciones de mayor esterilidad posible, fueron colocadas en recipientes estériles y luego se incubaron hasta 30 días a 4 ° C y 92% de HR para reproducir, en la mayor medida posible, las condiciones típicas de almacenamiento del queso.

Denominación de Muestras:

M0: queso control (sin recubrimiento)

M1: queso recubierto de amilosa (sin antimicrobiano)

M2: queso recubierto de almidón (sin antimicrobiano)

M3: queso recubierto de amilosa con 1 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano.

M4: queso recubierto de amilosa con 10 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano.

M5: queso recubierto de almidón con 1 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano.

M6: queso recubierto de almidón con 10 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano.

**Tabla 4.2** Cronograma de muestreo

<i>Tiempo (días)</i>	<i>0</i>	<i>10</i>	<i>20</i>	<i>30</i>
Muestras ensayadas para H y L y PCA	M0	M1, M2, M3, M4, M5, M6.	M3, M4, M5, M6	M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6

En momentos seleccionados, que se aclaran en la tabla 4.2, las muestras de queso a analizar, se despojaron de su recubrimiento, se pesaron y se homogeneizaron en agua con peptona (1:10) en bolsas estériles de muestreo y se colocaron un volumen de dilución (20 µL) por duplicado, en los medios adecuados para determinar el número de UFC / mL de cada microorganismo. Las levaduras y los mohos se enumeraron en placas que contenían agar H y L y fueron incubados a 28 °C durante 72 h. Las bacterias psicrótróficas se determinaron utilizando agar de recuento en placa (PCA) después de la incubación durante 5 días a 4 ± 1 °C.

Se realizó una enumeración de colonias y el crecimiento de microorganismos se expresó como log CFU / g. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### Ventajas e inconvenientes en las aplicaciones de los recubrimientos de almidón y amilosa

La inmersión en soluciones filmogénicas, presentó la problemática del secado del recubrimiento, además de que, al ser soluciones de concentraciones muy bajas, la adhesión de las mismas al queso resultó difícil. Si bien mediante esta técnica se logró recubrir exitosamente (secando las piezas recubiertas en ambiente de 4 °C y 35 %HR por 24 h), se observó que la mayor pérdida de peso se llevaba a cabo en este tiempo, y que el recubrimiento no era lo suficientemente evidenciable como para continuar con otros ensayos mas costosos, como ser los microbiológicos.

Por otro lado, la técnica del envoltorio de las piezas de queso con la película resultó en mayor practicidad y rapidez. No se observó en ningún momento la pérdida de la integridad de las películas ya que éstas, a pesar de tener la carga antimicrobiana, mantuvieron intacta su flexibilidad y homogeneidad original.

En la Figura 4.1 se puede observar una película de almidón de mandioca conteniendo la carga del antimicrobiano.



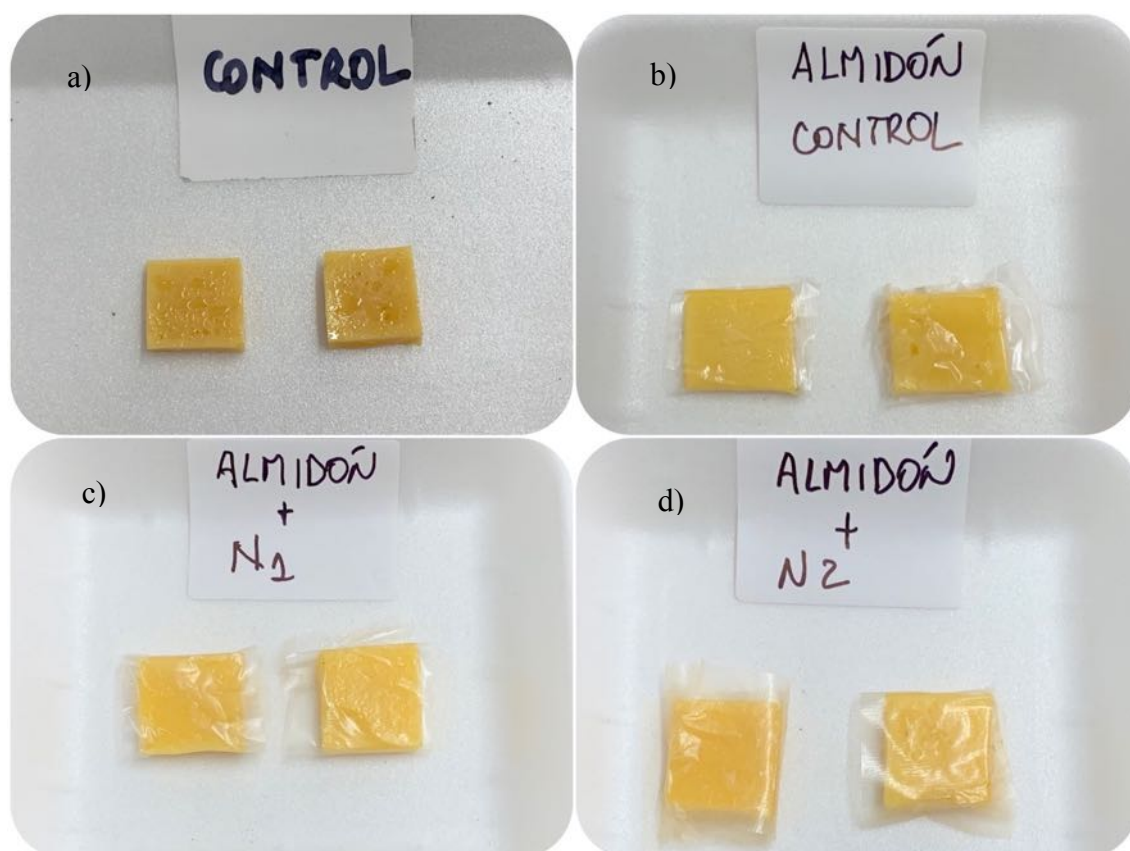
**Figura 4.1** Película de almidón de mandioca con carga de antimicrobiano ( $10 \text{ mg/dm}^2$  de natamicina)

Por otro lado, la película de envoltorio, soportó de manera adecuada todas las condiciones planteadas de humedad y temperatura, sin sufrir disolución visible en la superficie del queso. Esto llevó al autor de este trabajo a considerar el estudio propuesto de manera completa para los quesos recubiertos con las películas.

#### **Efecto de la temperatura y humedad relativa de almacenamiento en el desarrollo de microorganismos**

Dos condiciones de almacenamiento fueron ensayadas a fin de monitorear los cambios en la apariencia de los quesos, en función del desarrollo microbiano, evaluando los efectos de dos polímeros distintos, con dos niveles de natamicina y en dos formas de aplicación de recubrimiento.

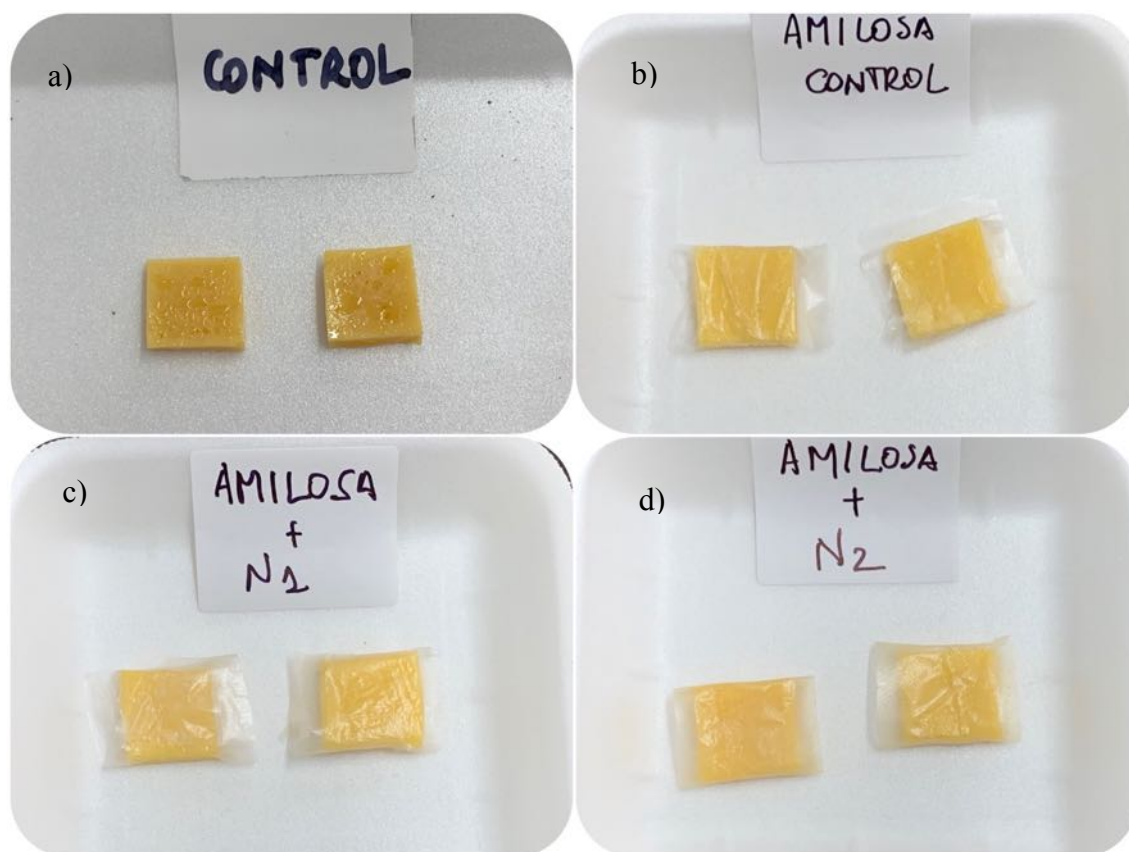
En la Figura 4.2 se observan quesos recubiertos con películas de almidón, almacenados a 25 °C en un ambiente de 50% HR por un tiempo de siete días.



**Figura 4.2** Efecto del almacenamiento en ambiente de 50% HR, 25 °C, por siete días de: a) queso sin recubrir, b) queso recubierto con película de almidón control, c) queso recubierto con película de almidón + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, d) queso recubierto con película de almidón + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina

En la Figura 4.3 se pueden analizar el efecto de los recubrimientos de amilosa.



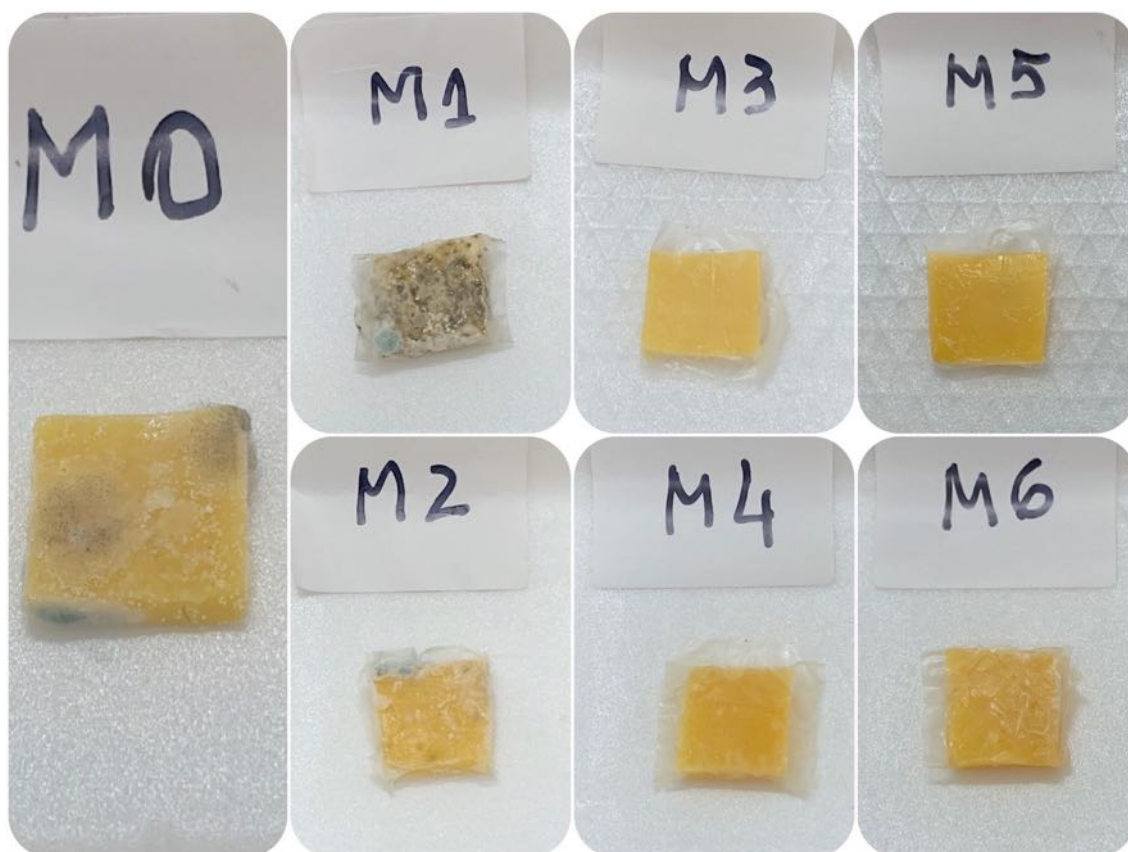


**Figura 4.3** Efecto del almacenamiento en ambiente de 50%RH, 25 °C, por siete días de:

- a) queso sin recubrir, b) queso recubierto con película de amilosa control, c) queso recubierto con película de amilosa + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, d) queso recubierto con película de amilosa + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina

Si bien se observa pérdida de humedad en los quesos, no se observa desarrollo de colonias de hongos, a pesar de la temperatura de incubación. Esto se debería a que la mayoría de los microorganismos presentes en el queso necesitan valores de  $a_w$  en el orden de 0,6 a 1 (Marcos, et al.,(1993)). En ambos ensayos puede observarse que el queso sin recubrimiento (control) sufre un mayor cambio de color que los quesos recubiertos, probablemente esto se debería a que la presencia de la película, condiciona la disponibilidad de oxígeno para las reacciones de oxidación de lípidos de los quesos. Por otro lado, cuando las muestras son almacenadas en condiciones de 92 %HR, 4°C por 20 días, el desarrollo de microorganismos fue evidente para algunas muestras (Figura 4.4).





**Figura 4.4** Efecto del almacenamiento en ambiente de 92%HR, 4 °C, por 20 días de:

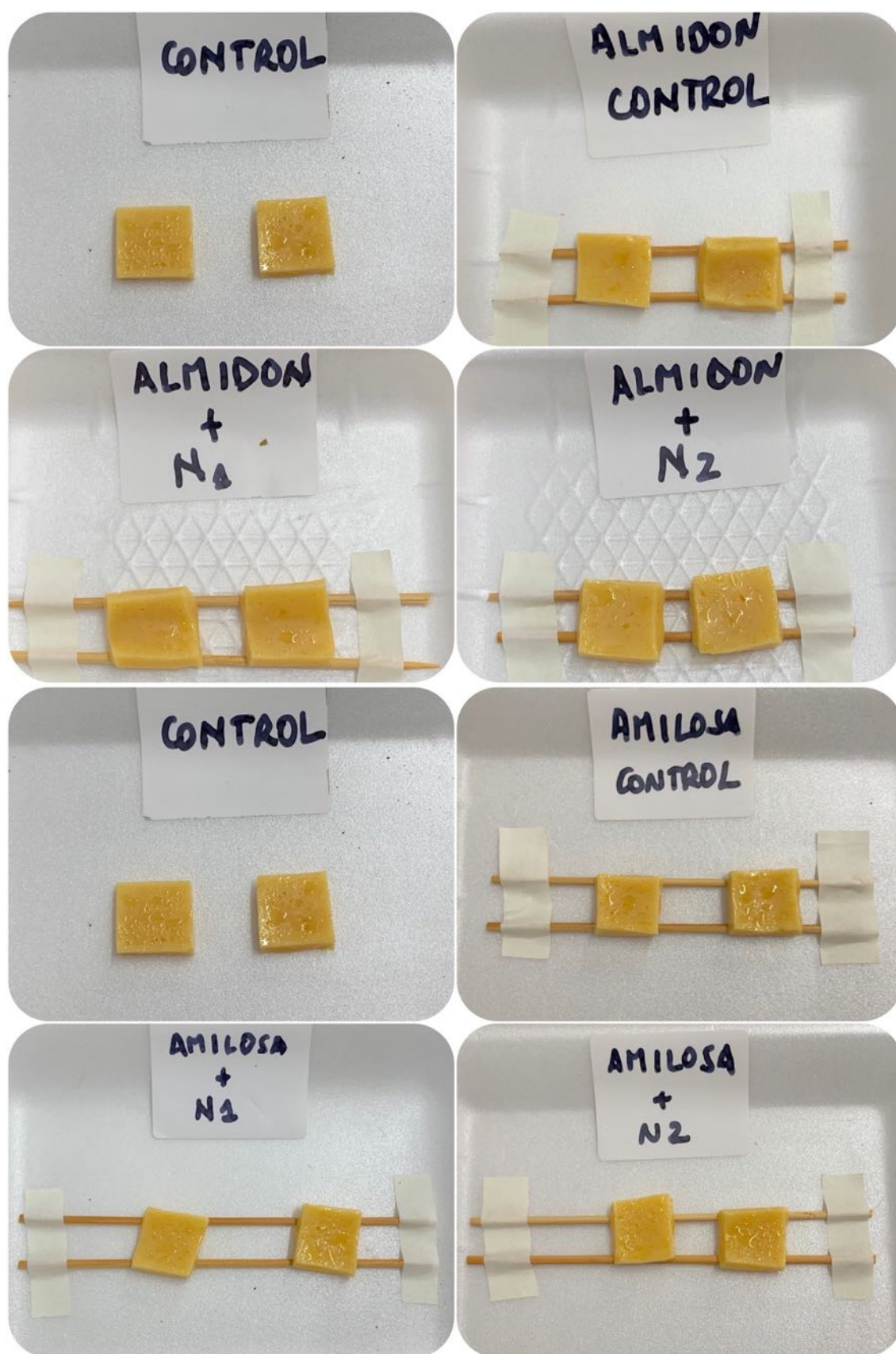
M0: queso sin recubrir, M1: queso recubierto con película de amilosa control, M2: queso recubierto con película de almidón control, M3: queso recubierto con película de amilosa + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, M4: queso recubierto con película de amilosa + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina. queso recubierto con película de amilosa control, M5: queso recubierto con película de almidón + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, M6: queso recubierto con película de almidón + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina

El desarrollo de microorganismos, hongos particularmente, fue el esperable debido al alto porcentaje de humedad en el ambiente de almacenamiento. El queso sin recubrir mostró una visible proliferación de hongos. En cuanto a las muestras recubiertas con amilosa (M1) y almidón (M2), se pudo observar que la presencia de la película no impidió la formación de microorganismos, ni en la superficie del recubrimiento ni en la superficie del alimento, por lo tanto, estas películas no son adecuadas para actuar como barrera contra la contaminación externa. Se encontró además que la muestra M1 presentó mayor desarrollo microbiano, que la muestra recubierta con films de almidón y que el queso sin recubrir. Se probó la actividad antifúngica recubriendo el queso con los films conteniendo natamicina en dos concentraciones, y como se demostró en la

experiencia ninguna muestra con antimicrobiano exhibió desarrollo evidente, ni en la superficie de la película ni en la del queso. La concentración mas baja de natamicina demostró ser adecuada para inhibir el desarrollo de hongos, para las condiciones de ensayo estudiadas. Fajardo et al., (2010) encontraron que la mínima concentración de natamicina capaz de inhibir el desarrollo de hongos en queso Saloio es de 0,2 mg/ mL de natamicina, mientras que, en el presente estudio, se ha obtenido la inhibición en el crecimiento de hongos utilizando una concentración de 0,027 mg/mL de natamicina equivalente a 1mg/dm<sup>2</sup> de película.

El estudio de los quesos recubiertos mediante inmersión, fue llevado a cabo para las condiciones de 50 % HR y 25 °C. Los ensayos en condiciones de 92 % HR y 4 °C no se realizaron, dado que no fue posible lograr el secado adecuado que asegure la uniformidad de los recubrimientos y las garantías en los resultados.

En la figura 4.5 puede observarse el efecto del almacenamiento en quesos recubiertos por la técnica de inmersión en soluciones filmogénicas.



**Figura 4.5** Efecto del almacenamiento en ambiente de 50%HR, 25 °C, por siete días de quesos recubiertos mediante técnica de inmersión

Como puede apreciarse en las imágenes, no se observaron diferencias considerables entre las muestras recubiertas y el queso sin recubrir (control). Tampoco puede observarse desarrollo microbiano para ninguna de las muestras ensayadas.

### Humedad

La humedad medida del queso regional seleccionado resultó del  $42,5 \pm 0,5$  %, al momento de su adquisición (tiempo cero).

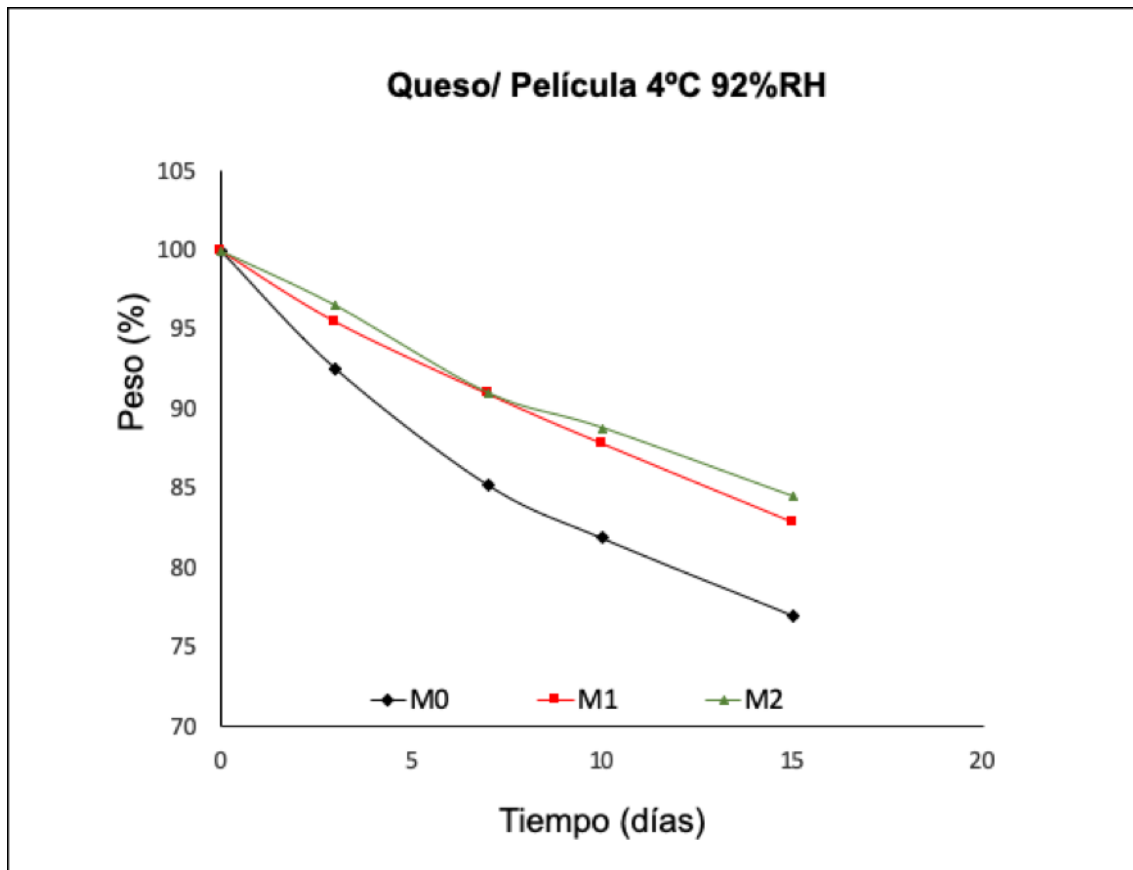
A los 30 días la variación de humedad fue similar para los quesos sin recubrir y para aquellos que fueron recubierto, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el efecto para los distintos recubrimientos. En la tabla 4.3 se muestran los contenidos de humedad de los quesos con 30 días de almacenamiento a 92% HR y 4 °C para los distintos recubrimientos ensayados.

**Tabla 4.3** Contenidos de humedad promedio de quesos almacenados a 92% HR y 4 °C.

<i>Muestra</i>	<i>Medias de humedad</i> (%)
M0	21,1
M1	19,5
M2	20,0
M3	19,7
M4	18,3
M5	18,3
M6	19,1

### Evaluación de pérdida de peso

La pérdida de humedad, expresada como pérdida porcentual de peso ( $\Delta w$  %) en muestras de quesos sin recubrir (M0), recubiertas con una película de amilosa (M1) y con una película de almidón (M2), almacenadas a 4 °C y 92 % HR pueden observarse en la Figura 4.6.



**Figura 4.6** Peso (%) en muestras de queso almacenadas 4 °C y 92 % HR

Como puede observarse la pérdida de peso fue mayor en la muestra sin recubrir, que alcanzó una disminución del 8 % a los 3 días de almacenamiento y a los 15 días perdió el 23 % de su contenido de humedad, mientras que los recubiertos no mostraron diferencias significativas entre si, y en ambos casos alcanzaron pérdidas de peso del 4,5 % y 18 % para los tiempos mencionados.

Los datos de pérdida de peso del queso sin recubrimiento, para 92% HR ajustaron a una ecuación de segundo orden ( $R^2=0.998$ ), mientras que para quesos recubiertos con almidón y con amilosa la pérdida de peso fue prácticamente lineal con un  $R^2 = 0.994$  y una velocidad de 1,12 %/ día.

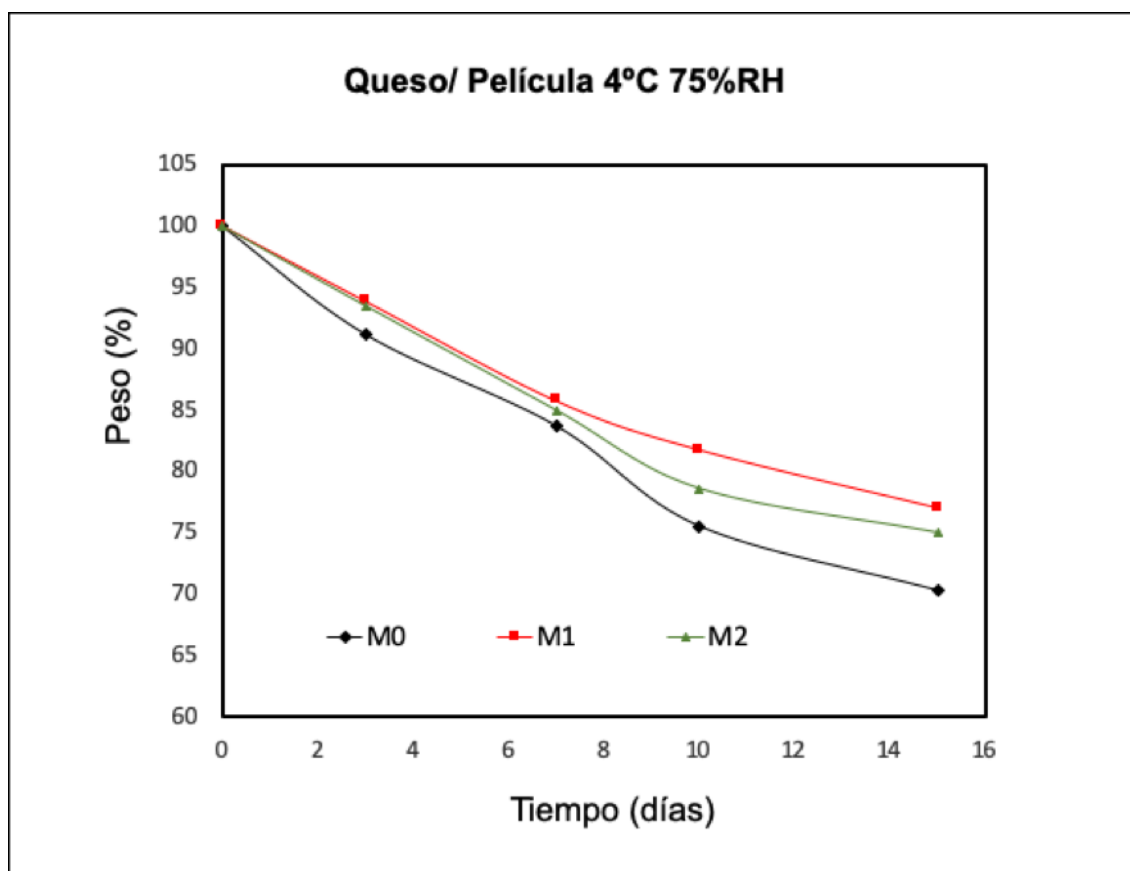
Los datos de pérdida de peso lineal con el tiempo de almacenamiento, encontrados para los quesos recubiertos, fueron similares a los reportados por Zhong et al., (2014) para queso mozzarella recubiertos con varios materiales (chitosan, alginato de sodio, proteína de soja) y expuestos a 4 °C y 85% HR, aunque a diferencia de este trabajo, Zhong encontró menor pérdida de peso en el queso no recubierto.

Una disminución de la pérdida de peso del queso Fior di Latte recubierto por inmersión en una solución de alginato de sodio, fué reportada por Conte et al., (2009).

Una menor pérdida de humedad, como la obtenida en este trabajo, es informada también por Cerqueira et al., (2010), quienes para un queso semi-duro “regional”, encontraron una pérdida de peso 2,5% menor en quesos recubiertos respecto a los no tratados, para almacenamiento a 4 °C y 78 % HR.

En la Figura 4.7 se presentan los resultados de experiencias para muestras similares, almacenadas a la misma temperatura 4 °C, pero expuestas a 75% HR.

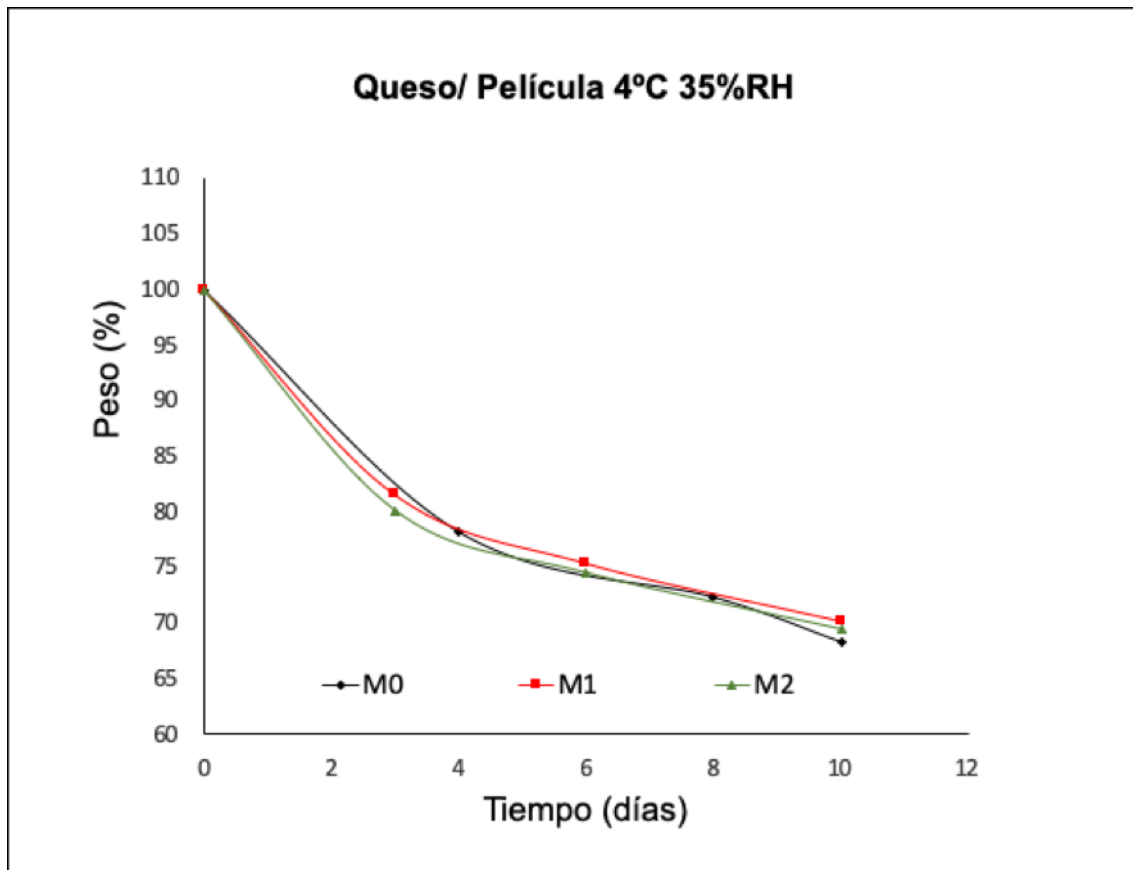
Se pudo observar que la pérdida de peso también fue mayor en el queso sin recubrir, en comparación con los recubiertos con películas de almidón o de amilosa. Los datos de disminución de peso en las muestras sin recubrir se pudieron ajustar con una ecuación de segundo orden  $R^2 = 0,999$  (igual que en el caso de 92% HR) pero en este caso la pérdida de humedad a los 15 días fue del 30 %. En el caso de las muestras recubiertas, si bien los datos tuvieron alguna dispersión se pudo apreciar que no fueron lineales y a los 15 días la pérdida de humedad fué del 23-25 %.



**Figura 4.7** Peso (%) en muestras de queso almacenadas 4 °C y 75 % HR

Los resultados de experiencias a 4 °C y 35% HR se muestran en la Figura 4.8.



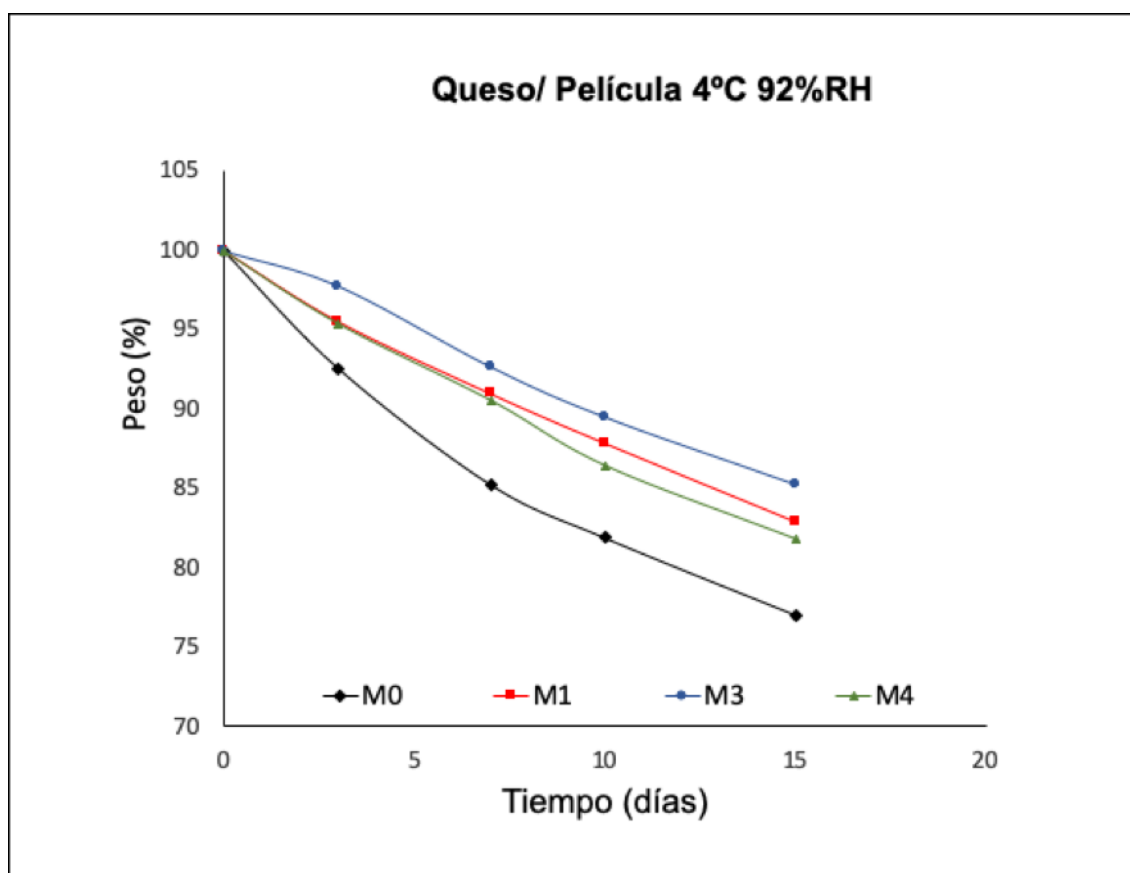


**Figura 4.8** Peso (%) en muestras de queso almacenadas 4 °C y 35 % HR.

Las muestras expuestas a 4 °C y 35% HR también mostraron una disminución de la humedad con el tiempo, pero en este caso todas las muestras sufrieron pérdida de humedad similares y la gráfica pareció presentar dos zonas con velocidades diferentes, alta al principio (posible de ajustar con segundo orden  $R^2= 1$ ) y luego una velocidad menor, prácticamente lineal con una velocidad de 0,36 %/día y una pérdida de humedad para los 13 días de 32%.

Este comportamiento podría deberse a que cuando disminuye la humedad superficial del queso, se forma una zona de difícil transporte del agua desde interior del alimento a la superficie, lo que implica una barrera que hace disminuir la velocidad del secado (0,36 %/día).

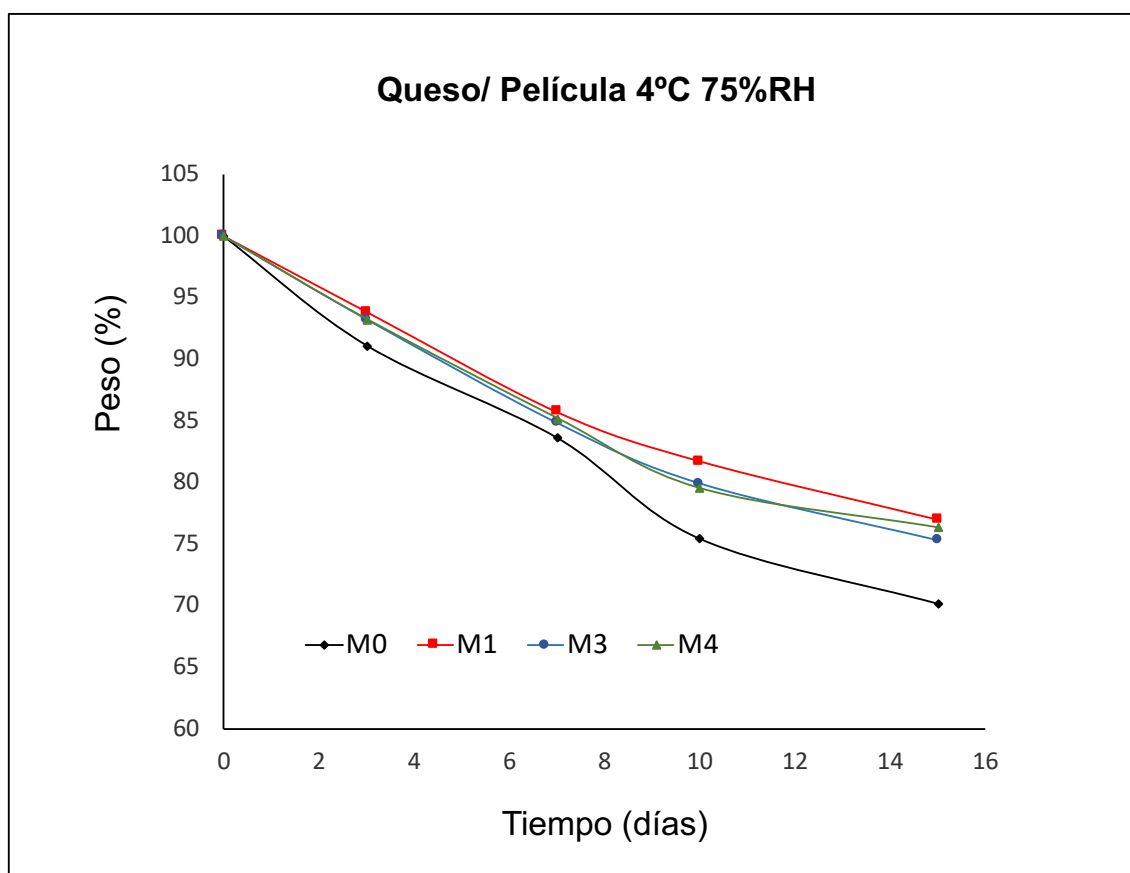
Las experiencias de pérdida de peso en relación al agregado del componente activo a las películas pueden verse en la Figuras 4.9. Para el estudio con películas de amilosa, expuestas a condiciones de 4 °C y 92 % HR se incluyeron en la gráfica el control M0 (queso sin recubrir).



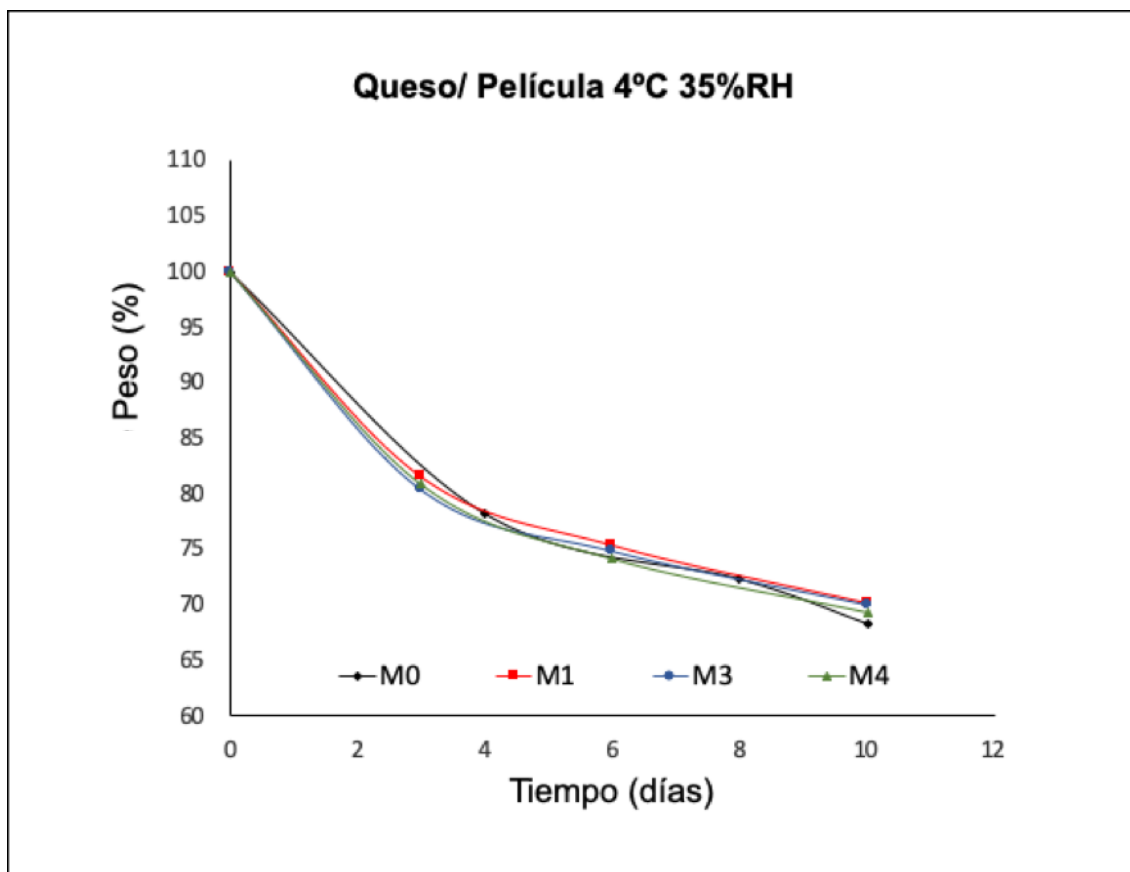
**Figura 4.9** Peso (%) en relación al agregado del componente activo para 92% HR

Los resultados de experiencias similares, pero para almacenamientos a la misma temperatura 4 °C, expuestas a humedades relativas de 75 y 35 % HR respectivamente, son presentados en las Figuras 4.10 y 4.11.



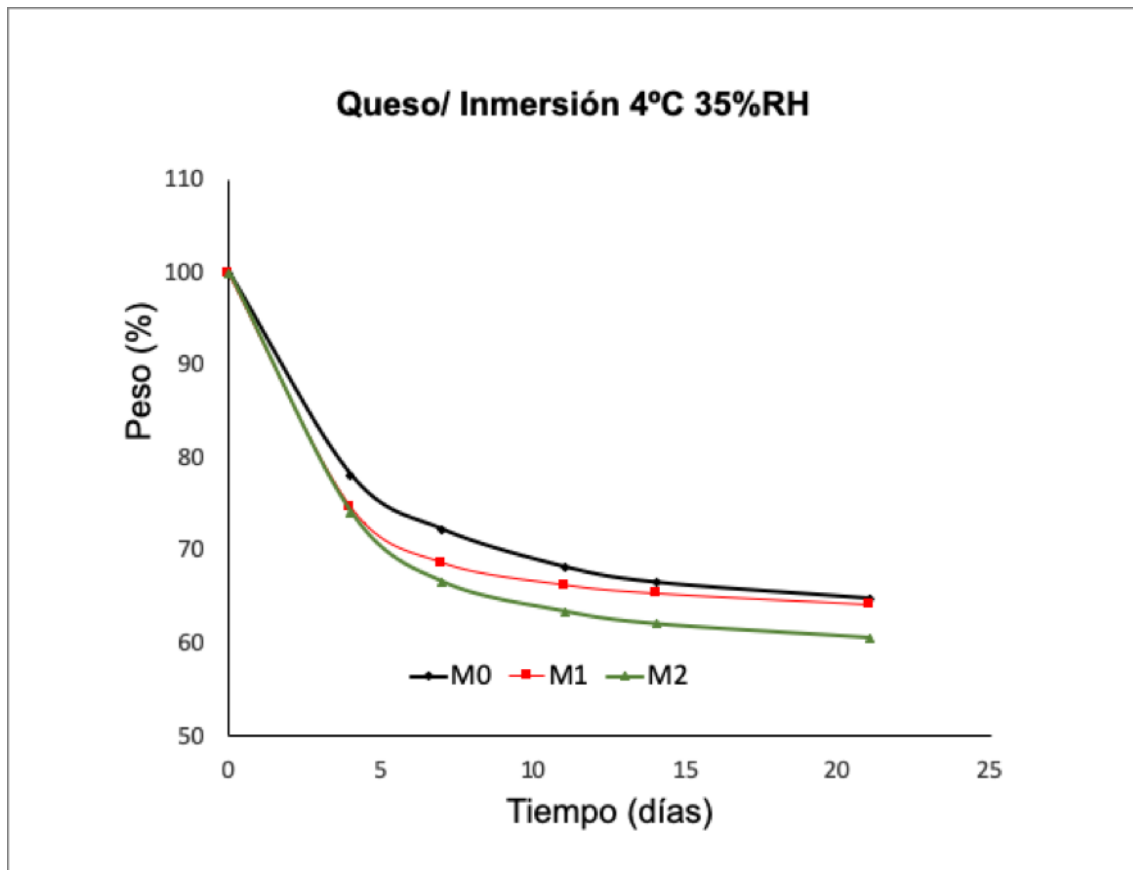


**Figura 4.10** Peso (%) en relación al agregado del componente activo para 75% HR.



**Figura 4.11** Peso (%) en relación al agregado del componente activo para 35% HR.

Se puede observar que en todos los casos el agregado del componente activo, en ambas concentraciones ensayadas, no afectó la pérdida de peso, que resultó similar a la de los quesos recubiertos con una película de amilosa sin natamicina. En el caso de los ensayos de recubrimientos por inmersión, los resultados se muestran en la Figura 4.12



**Figura 4.12** Peso (%) en muestras de queso recubiertas por inmersión, almacenadas 4 °C y 75 % HR.

Se observa que, en este caso, a diferencia de los quesos recubiertos con películas, las muestras tratadas con inmersión perdieron mas humedad que el queso control. En este caso el comportamiento es similar al reportado por Zhong et al., (2014).

Se considera que este hecho se podría deber a que el recubrimiento no alcanza a formar un film continuo, y por el contrario, evita que al disminuir la humedad superficial del queso se forme una zona de difícil difusión del agua desde el interior a la superficie, como ocurría en el queso no tratado.

### Recuento microbiológico

El recuento de hongos y levaduras se muestra en la Tabla 4.4. Los ensayos mostraron diferencias significativas entre las muestras de quesos sin recubrir y las recubiertas con almidón y 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina (M6) para un tiempo de almacenamiento de 30 días ( $p>0,05$ ).

**Tabla 4.4.** Registro de recuentos totales de hongos y levaduras (log CFU/g) de las muestras de queso con y sin recubrimientos durante el almacenamiento a 4 ° C.

MUESTRA/TIEMPO	0	10	20	30
M0	5,98±0,00 <sup>a</sup>	--	--	8,98±0,14 <sup>a</sup>
M1	6,00±0,06 <sup>a</sup>	7,93±0,02 <sup>a</sup>	--	9,87±0,04 <sup>b</sup>
M2	5,95±0,00 <sup>a</sup>	7,45±0,01 <sup>b</sup>	--	8,83±0,00 <sup>a</sup>
M3	5,98±0,01 <sup>a</sup>	6,93±0,01 <sup>c</sup>	7,77±0,13 <sup>a</sup>	9,20±0,00 <sup>c</sup>
M4	5,94±0,03 <sup>a</sup>	6,68±0,00 <sup>d</sup>	7,02±0,02 <sup>bc</sup>	8,99±0,01 <sup>ac</sup>
M5	5,97±0,00 <sup>a</sup>	6,79±0,00 <sup>e</sup>	7,32±0,05 <sup>ab</sup>	8,67±0,00 <sup>a</sup>
M6	5,95±0,02 <sup>a</sup>	6,38±0,02 <sup>f</sup>	6,78±0,08 <sup>c</sup>	7,89±0,03 <sup>d</sup>

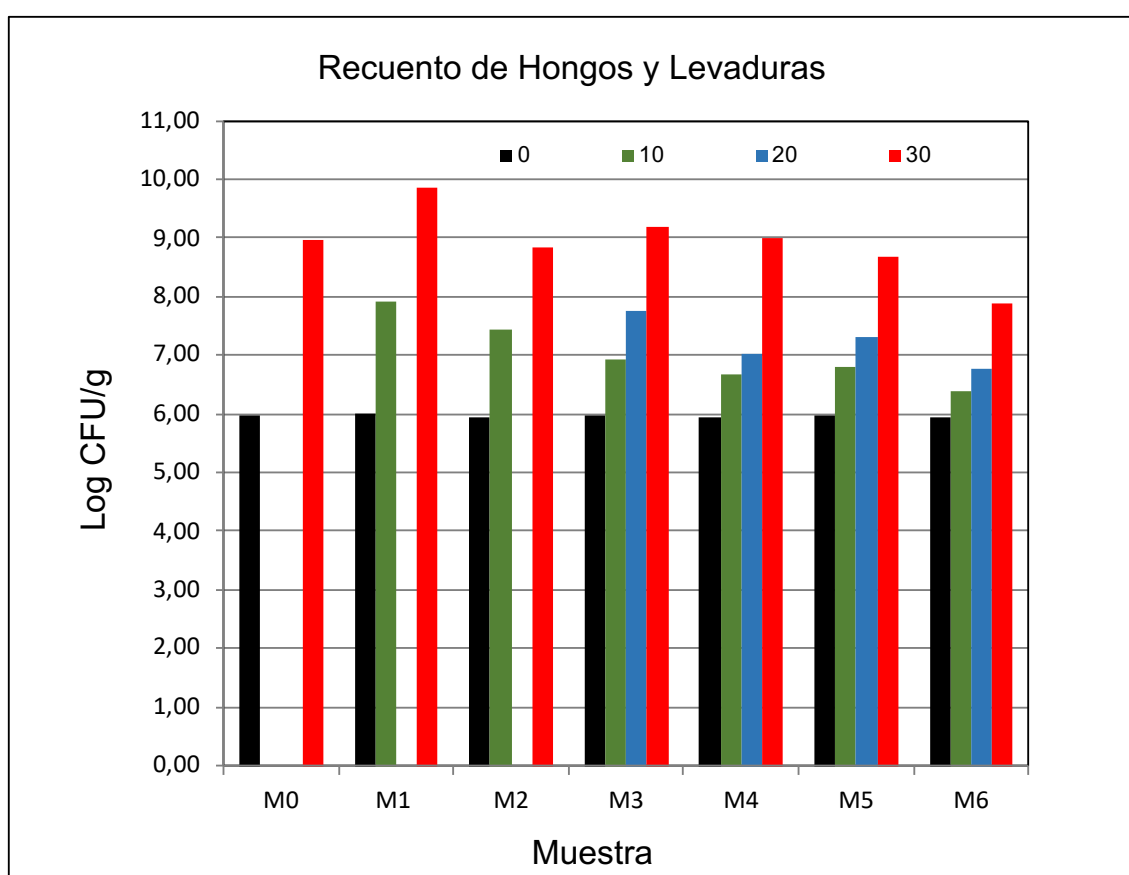
Cada muestra fue procesada por triplicado.

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas para un nivel de confianza de 95%

En los análisis realizados a los 10 días de almacenamiento, se verificó estadísticamente un menor crecimiento en los quesos recubiertos con almidón y en los dos niveles de antimicrobiano ensayados (M5 y M6), como también para los recubiertos con amilosa y antimicrobiano (M3 y M4), comparados con los desarrollos para los quesos recubiertos con ambos polímeros y sin antimicrobiano (M1 y M2), que mostraron un mayor desarrollo. A este tiempo también se aprecia un efecto de la concentración de natamicina y el mejor desempeño lo tuvo la muestra M6, que, desde las primeras horas de ensayo, mostró un efecto fungicida.

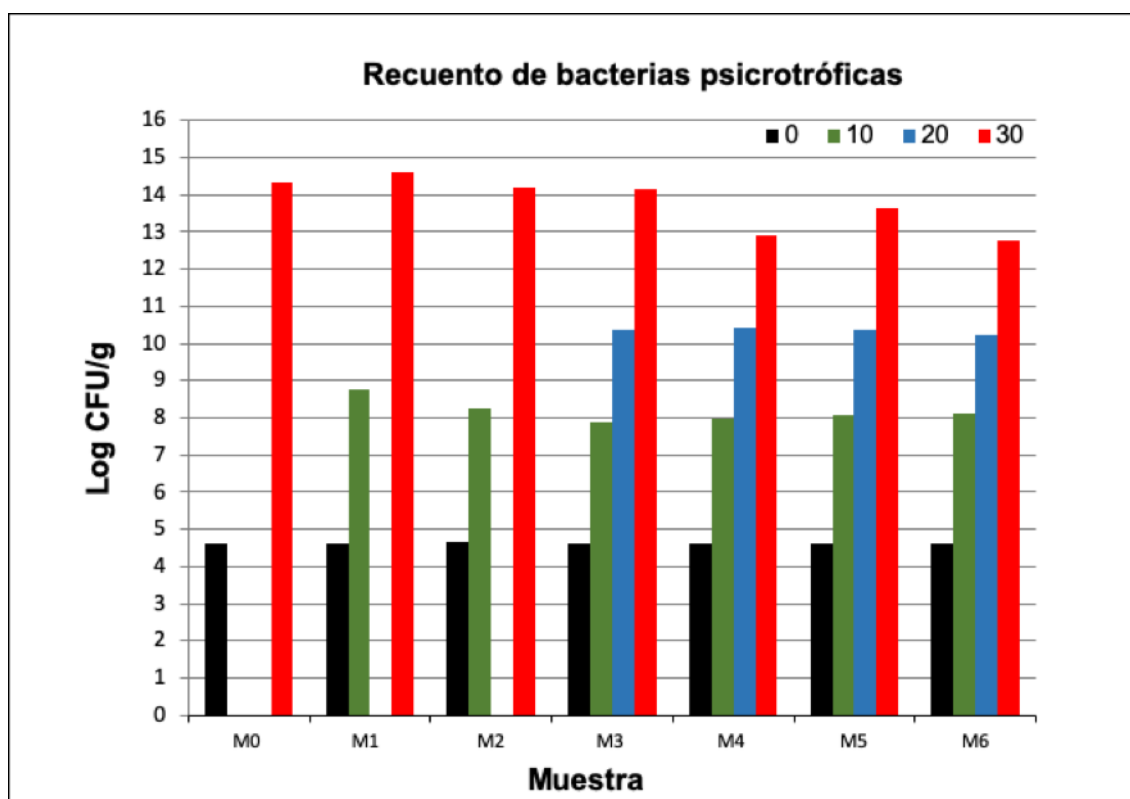
Para el día 20, se encontró una tendencia similar a lo antes descripto (10 días), resultando un menor desarrollo en los quesos recubiertos con 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, no habiendo diferencia significativa entre los distintos polímeros, como se puede observar también en la Figura 4.13.

Al día 30 no existió diferencia significativa en el desarrollo de hongos y levaduras en M0, M2, M4 y M5, sin embargo, el crecimiento en el queso recubierto M1 fue mayor a todas las otras muestras, hecho que se correlacionó con la observación visual (Figura 4.4). Fajardo et al., (2010), no encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los recuentos microbiológicos entre quesos recubiertos y no recubiertos sin inoculación a temperaturas refrigeradas, para recubrimientos de quitosán y natamicina. Sin embargo, Ollé Resa et al., (2014) y (2016) encontraron que recubrimientos de almidón de mandioca conteniendo natamicina y nisina como antimicrobianos fueron efectivos para impedir el crecimiento de hongos y levaduras.



**Figura 4.13** Recuento total de hongos y levaduras durante el período de almacenamiento de queso regional tipo barra.

El análisis de los recuentos de bacterias psicrotróficas totales se muestran en la figura 4.14.



**Figura 4.14** Recuento total de bacterias psicrotróficas durante el período de almacenamiento de queso regional tipo barra

Si bien hay significancia estadística ( $\alpha=0,05$ ) para todos los tiempos de almacenamiento entre los quesos sin recubrir y los quesos recubiertos, la mayor diferencia significativa ocurrió para 30 días, donde el recubrimiento M6 mostró el mejor desempeño en el control del crecimiento de bacterias psicrotróficas. Esta tendencia fue compartida, pero en menor medida, por M4 para el mismo tiempo de almacenamiento. Si bien es conocido que la natamicina tiene propiedades antifúngicas, se ha encontrado que en los recubrimientos que contenían el antimicrobiano, preferentemente en concentraciones de 10 mg/dm<sup>2</sup> han resultado significativamente mejores en el control del crecimiento bacteriano. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.5. El autor de este trabajo considera que este efecto, podría ser consecuencia del contenido de ClNa con la que se comercializa la natamicina, que para las películas resultaron en 10mg por dm<sup>2</sup> de superficie al igual que el antimicrobiano. Las bacterias psicrofílicas son sensibles a altos contenidos de sal en los quesos. Fajardo et al., (2010) informan que estas bacterias causan pérdidas económicas importantes como resultado de las actividades lipolíticas y proteolíticas.

**Tabla 4.5.** Registro de recuentos totales de bacterias psicrotróficas (log CFU/g) de las muestras de queso con y sin recubrimientos durante el almacenamiento a 4 ° C.

MUESTRA/TIEMPO	0	10	20	30
M0	4,64±0,00 <sup>a</sup>			14,33±0,03 <sup>a</sup>
M1	4,63±0,00 <sup>a</sup>	8,77±0,04 <sup>a</sup>		14,62±0,02 <sup>a</sup>
M2	4,66±0,03 <sup>a</sup>	8,24±0,01 <sup>b</sup>		14,18±0,06 <sup>ab</sup>
M3	4,63±0,00 <sup>a</sup>	7,88±0,01 <sup>c</sup>	10,39±0,02 <sup>a</sup>	14,13±0,03 <sup>ab</sup>
M4	4,64±0,01 <sup>a</sup>	7,96±0,02 <sup>d</sup>	10,42±0,02 <sup>b</sup>	12,91±0,02 <sup>c</sup>
M5	4,64±0,01 <sup>a</sup>	8,09±0,01 <sup>e</sup>	10,39±0,02 <sup>a</sup>	13,62±0,02 <sup>b</sup>
M6	4,64±0,01 <sup>a</sup>	8,10±0,01 <sup>e</sup>	10,22±0,02 <sup>c</sup>	12,78±0,43 <sup>c</sup>

Cada muestra fue procesada por triplicado.

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas para un nivel de confianza de 95%

## CONCLUSIONES

Queso regional de tipo barra fue recubierto con matrices de almidón de mandioca y amilosa de mandioca, con y sin natamicina como antimicrobiano. De las dos formas de aplicación del recubrimiento estudiadas, solo el envoltorio con la película ya formada demostró ser estable para los tiempos de almacenamiento ensayados.

El recubrimiento de queso “regional” con películas de almidón de mandioca o amilosa disminuyó la pérdida de peso (cuando fue almacenado a 4°C y 92%HR) en casi un 50 % para los 3 días y en un 22% a los 15 días de ensayo, respecto al queso sin tratar.

El recubrimiento de los quesos con todas las formulaciones ensayadas también disminuyó el cambio de color en las muestras.

Los resultados microbiológicos demuestran que el recubrimiento con películas de almidón de mandioca, con el agregado de natamicina, en las dos concentraciones ensayadas, constituye un medio efectivo para controlar la población de hongos y levaduras, hasta los 20 días de almacenamiento en condiciones refrigeradas.

Los resultados de este trabajo de tesis, demuestran que el recubrimiento de quesos con película de almidón y 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina (M6) es un método efectivo para controlar la población de hongos y levaduras, presentes tanto en el queso como en la película, así como retrasar el crecimiento de bacterias psicrotróficas, lo que permitiría

aumentar la vida útil del alimento (queso barra) y ofrecer al consumidor un producto mejor conservado.

## **ABREVIATURAS**

---

IDF: International Dairy Federation

CODA: Código Alimentario Argentino

OMS: Organización Mundial de la Salud

FDA: Food and Drug Administration

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

M0: queso control (sin recubrimiento)

M1: queso recubierto de amilosa (sin antimicrobiano)

M2: queso recubierto de almidón (sin antimicrobiano)

M3: queso recubierto de amilosa con 1 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano

M4: queso recubierto de amilosa con 10 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano

M5: queso recubierto de almidón con 1 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano

M6: queso recubierto de almidón con 10 mg/dm<sup>2</sup> de antimicrobiano

PCA:

L Y H: Hongos y Levaduras

%HR: porcentaje de humedad relativa

UFC: Unidad formadora de colonias



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Cerqueira, M. A., Sousa-Gallagher, M. J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 87–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.019>
- Conte, A., Gammariello, D., Di Giulio, S., Attanasio, M., & Del Nobile, M. A. (2009). Active coating and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 887–894.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1500>
- Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2324–2327.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.031>
- Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>
- Lucera, A., Mastromatteo, M., Conte, A., Zambrini, A. V., Faccia, M., & Del Nobile, M. A. (2014). Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 25–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2013.10.002>
- Marcos, A. (1993). Water Activity in Cheese in Relation to Composition, Stability and Safety. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 439–469.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_11)
- Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2016). Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. *Food Control*.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.056>

- Ollé Resa, C. P., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.049>
- Youssef, A. M., Assem, F. M., El-Sayed, S. M., Salama, H., & Abd El-Salam, M. H. (2017). Utilization of Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Preservation of Cheeses. *Journal of Packaging Technology and Research*, 1(2), 87–99. <https://doi.org/10.1007/s41783-017-0012-3>
- Zhong, Y., Cavender, G., & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.006>

## *CAPÍTULO 5*

### *Conclusiones generales -Información complementaria*

---

## CONCLUSIONES GENERALES

---

En el presente trabajo de tesis se sintetizó acetato de almidón de mandioca de alto grado a partir de almidón nativo, resultando a partir de la reacción de esterificación, un material polimérico más termoestable y produciendo un cambio radical en la morfología del gránulo de almidón. Los espectros FTIR de almidones acetilados confirmaron la formación del éster altamente sustituido.

Es importante tener en cuenta que en este trabajo, a diferencia de otros, una completa caracterización estructural, morfológica y fisicoquímica tanto de el almidón nativo de mandioca como de acetatos de almidón de mandioca, fue llevada a cabo. Se demostró que la espectroscopía de RMN podría usarse como una herramienta rápida y precisa para el análisis estructural de almidón nativo y acetilado y las asignaciones de señales en los espectros de RMN de los materiales preparados se verificaron con las asignaciones de espectros de correlación independientes (2D RMN). Esta técnica permitió establecer que el almidón de mandioca es altamente ramificado, dato que no ha sido reportado por la bibliografía hasta el momento y determinar el grado de sustitución de los almidones acetilados, con datos más precisos, que sin embargo fueron concordantes con los obtenidos mediante la titulación por retorno. Además, a través de la espectroscopía  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN también fue posible determinar el patrón de sustitución regioselectivo, encontrándose que la posición de acetilación más favorable para el almidón de mandioca es C6, seguido de C2 y C3, una declaración en la que no hay coincidencia en la bibliografía. Los grados de sustitución (DS) obtenidos por titulación estuvieron entre 1.9 y 2.9. El análisis termogravimétrico mostró un aumento en la estabilidad térmica con la acetilación, la muestra DS = 2.9 se comportó como un homopolímero. Las micrografías SEM mostraron la pérdida de la estructura del gránulo de almidón y la aparición de nuevas estructuras en forma de colmena.

El conocimiento de las propiedades de los polímeros de carbohidrato permitió inferir su comportamiento en el estado coloidal.

A partir de la información obtenida, fue posible obtener películas dúctiles de espesor homogéneo y buenas propiedades mecánicas de almidón de mandioca en concentraciones por debajo el 1%, utilizando solamente agua como plastificante externo, mediante gelatinización a alta temperatura (120 °C).

Mediante una modificación del Método de Mukerjea, se logró la separación de amilosa y amilopectina de mandioca y el desarrollo de películas de ambas fracciones con buenas propiedades mecánicas y utilizando solamente agua como plastificante. Las películas de amilosa resultaron insolubles en agua a temperatura ambiente, mientras que las de amilopectina se disolvieron rápidamente para las condiciones del ensayo.

Los difractogramas de rayos X mostraron que todas las películas desarrolladas resultaron amorfas, observándose pocos picos cristalinos y de baja intensidad, manteniéndose esta tendencia no solo en los materiales recién moldeados sino también en aquellas películas que fueron almacenadas. El patrón de difracción en los casos, en que fue posible su determinación, fue de tipo A. Los picos en el espectro infrarrojo asociados a la cristalinidad se encontraron ausentes para todas las películas de almidón y sus fracciones.

Se consiguió retrasar de manera significativa la retrogradación de los films de almidón y sus fracciones. El tratamiento térmico utilizado para gelatinización del almidón, está directamente involucrado en la destrucción completa de la cristalita, produciendo el efecto antes mencionado, junto con los bajos contenidos de humedad que presentaron los films. La estabilidad térmica para las películas de amilosa y amilopectina fue semejante a la de películas de almidón.

Las películas de almidón de mandioca acetilado de  $DS=2,9$  resultaron homogéneas y continuas, de apariencia plástica, pero muy frágiles. El agregado 50% de DSA permitió obtener películas con buenas propiedades mecánicas (tensión de rotura 17,5 MPa, deformación 8%) pero que con el almacenamiento, se volvieron cerosas y frágiles.

Dada las propiedades de solubilidad, propiedades mecánicas, permeación al vapor de agua y efecto de almacenamiento de los materiales estudiados, soluciones filmogénicas y películas de almidón y amilosa de mandioca fueron seleccionadas para su estudio como recubrimiento activo.

Queso regional de tipo barra fue recubierto con estas matrices poliméricas (almidón y amilosa de mandioca), con y sin natamicina como antimicrobiano. De las dos formas de aplicación del recubrimiento estudiadas (inmersión y envoltorio con película), solo esta última demostró ser estable para los tiempos de almacenamiento ensayados.

El recubrimiento de queso “regional” con películas de almidón de mandioca o amilosa disminuyó la pérdida de peso (cuando fue almacenado a 4°C y 92%HR) en casi un 50 %

para los 3 días y en un 22% a los 15 días de ensayo, respecto al queso sin tratar.

El recubrimiento de los quesos con todas las formulaciones ensayadas también disminuyó el cambio de color en las muestras.

Los resultados microbiológicos demuestran que el recubrimiento con películas de almidón de mandioca, con el agregado de natamicina, en las dos concentraciones ensayadas, constituye un medio efectivo para controlar la población de hongos y levaduras, hasta los 20 días de almacenamiento en condiciones refrigeradas.

Los resultados de este trabajo de tesis, demuestran que el recubrimiento de quesos con película de almidón de mandioca y 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina (M6) es un método efectivo para controlar la población de hongos y levaduras, presentes tanto en el queso como en la película, así como retrasar el crecimiento de bacterias psicrotróficas, lo que permitiría aumentar la vida útil del alimento (queso barra) y ofrecer al consumidor un producto mejor conservado.

## INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

---

## Sección experimental 1

Para la síntesis de acetato de almidón de mandioca de alta sustitución, se utilizó una modificación mínima del método de Feuer (Patente N° 5710269, 1998), que propone una reacción en medio ácido con ácido metilsulfónico como catalizador.

### **Procedimiento general para la preparación de acetato de almidón con DS = 2,9**

El almidón de mandioca comercial (30 g., 0.18 mol) se secó previamente en estufa de vacío a 50 ° C durante la noche, se mezcló con anhídrido acético frío (5 ° C) (54 ml, 0.57 mol) y ácido acético glacial (55 ml, 0.96 mol). La mezcla se calentó a 40°C bajo agitación magnética y luego se incorporó el catalizador de reacción: ácido metilsulfónico (0,38 ml, 5,85 mmol) previamente diluido en ácido acético (5 ml, 0,08 mol), lentamente (aproximadamente 1 ml / min) durante Un período de 10 minutos. La mezcla se mantuvo bajo agitación constante a una temperatura entre 85 ° C y 95 ° C durante 120 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se añadió agua destilada fría (5-6 ° C) a la solución para detener la reacción y precipitar el acetato de almidón. El precipitado blanco obtenido se lavó dos veces con agua destilada y una vez con metanol, se secó en estufa a 40 ° C durante 24 horas y se almacenó en un desecador a temperatura ambiente. En estas condiciones, el rendimiento de la reacción fue del 85% (45,3 g). ATR/FTIR: (polvo) 1749 y 1375 cm<sup>-1</sup>.



## **Sección experimental 2**

Para la separación de amilosa y amilopectina de almidón de mandioca, se utilizó una modificación mínima del método de Mukerjee (mukerjee y Robyt, (2010)), que propone una separación con n-butanol.

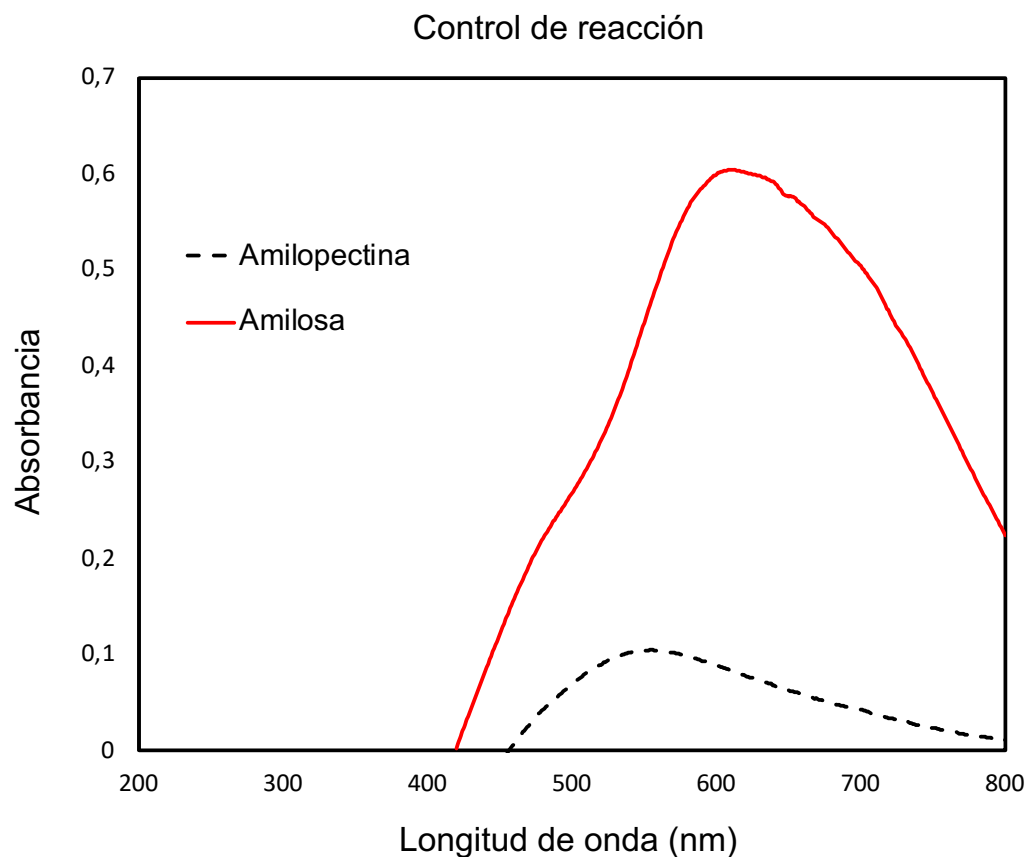
### **Procedimiento general para la preparación de amilosa y amilopectina de almidón de mandioca**

El almidón de mandioca comercial (26,25 g, 0,16 mol) se secó previamente en estufa a 50 ° C durante la noche, se mezcló con 1000 mL de agua destilada en un agitador magnético con agitación controlada (500 rpm) por 20 min a temperatura ambiente de 25 °C. La mezcla se gelatinizó a 120 ° C por una h en un autoclave. Una vez finalizado el proceso de gelatinización del sistema, el gel obtenido se enfrió a 40 ° C y se incorporó el n-butanol (175 mL, 1,91 moles) manteniendo la mezcla bajo agitación constante por 72 h a 25 °C. Una vez homogenizada la solución se centrifugó a 4500 rpm por 1 h. Luego, se resuspendió el precipitado (amilosa) en 250 mL de agua destilada y se destiló por arrastre de vapor para eliminar el n-butanol de la solución. El sobrenadante (amilopectina) se destiló por arrastre de vapor para eliminar el n-butanol de la solución. Ambas soluciones se mantuvieron refrigeradas a 4 ° C.

### **Verificación de separación de amilosa y amilopectina mediante espectrofotometría UV**

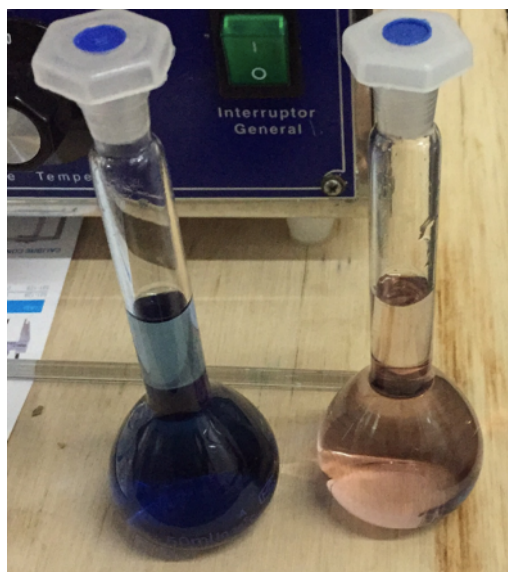
#### **Reacción de triyoduro con muestras de almidón**

Se añadieron 50 µL (2 mg I<sub>2</sub> + 20 mg KI / mL de agua) a 3 mL de agua que contenía 0,5 mg (0.167 mg / ml) de muestras de amilosa y amilopectina. Las absorbancias registradas se muestran en la Figura S1.

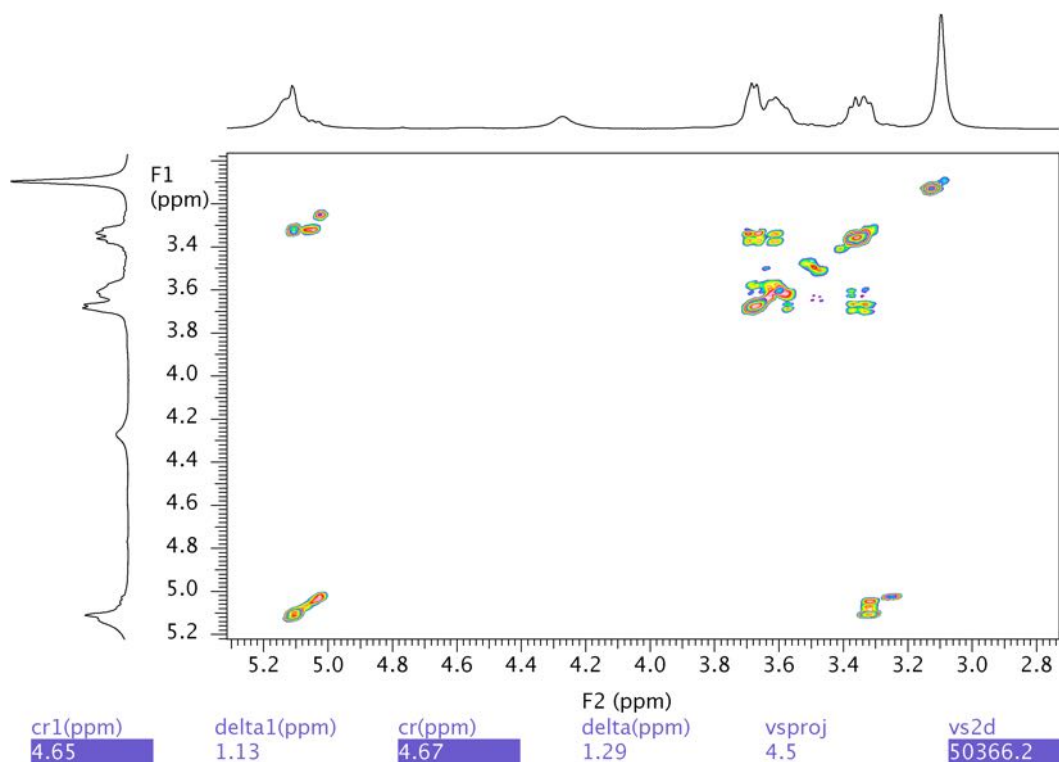
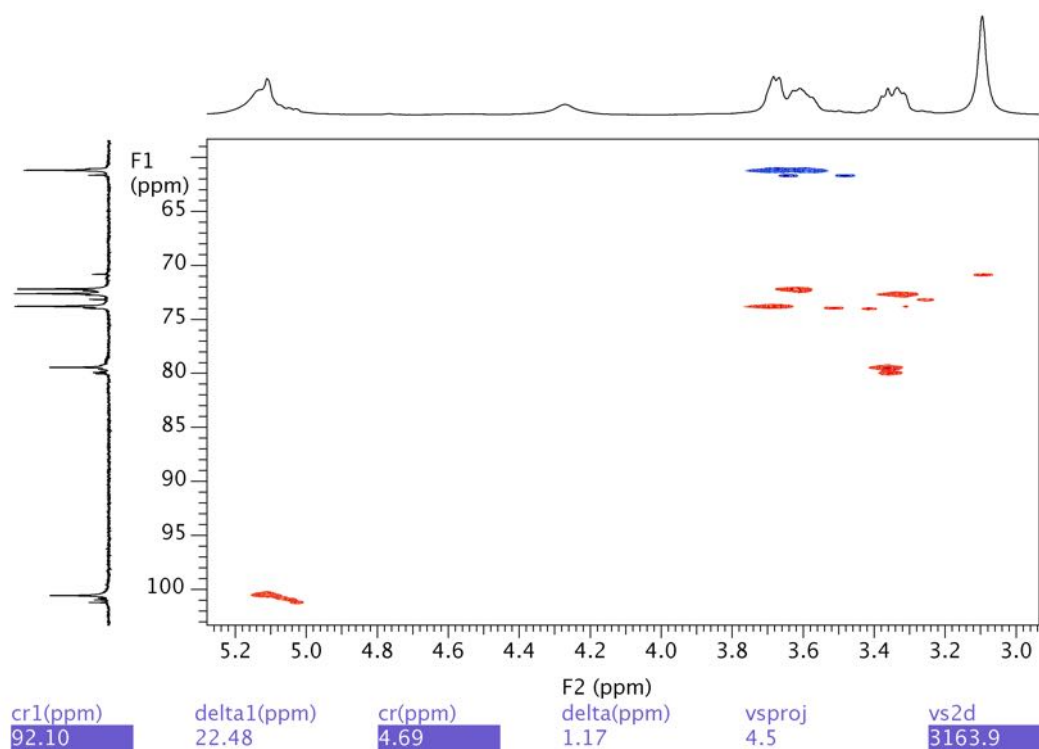


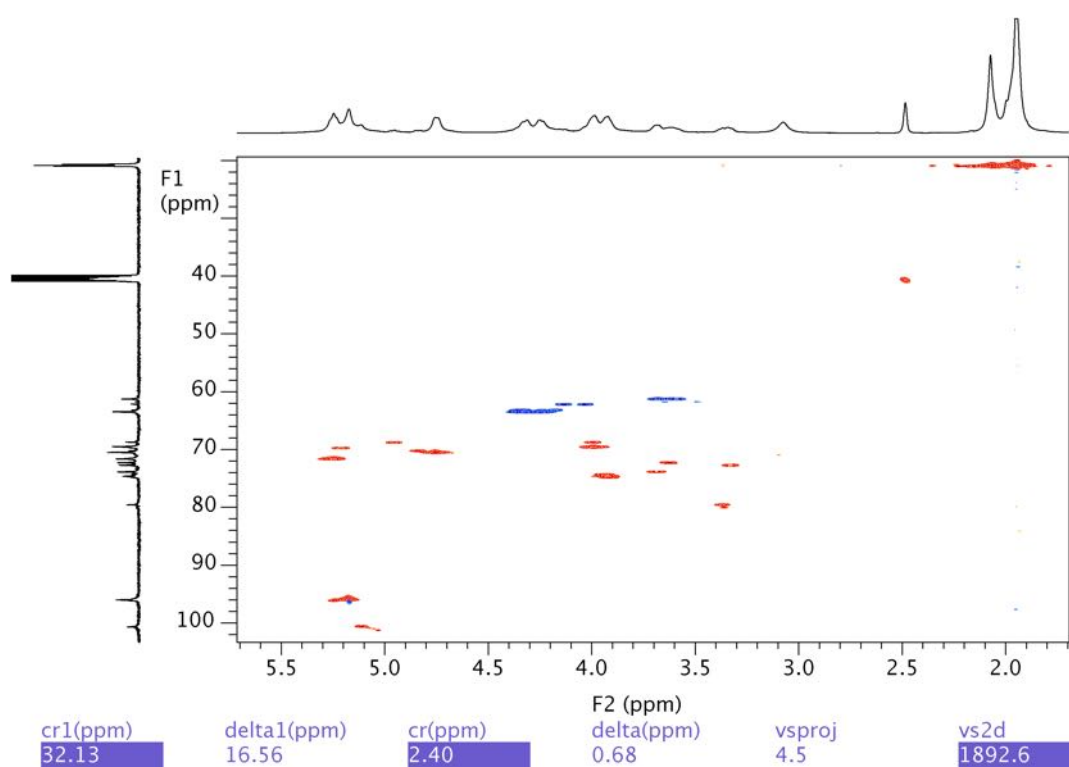
**Figura S1.** Control de reacción de amilosa y amilopectina.

La amilopectina tiene una pequeña banda de absorción con un máximo a 520-540 nm, mientras que la amilosa una gran banda de absorción en un rango entre 620-635 nm (Swanson (1947), Knutson, (1986)). En la Figura S2 se pueden observar las soluciones de amilosa (izquierda) y amilopectina (derecha), la formación del complejo con triyoduro es evidente en el desarrollo del color azul en el primer caso, y el violeta rojizo para amilopectina.

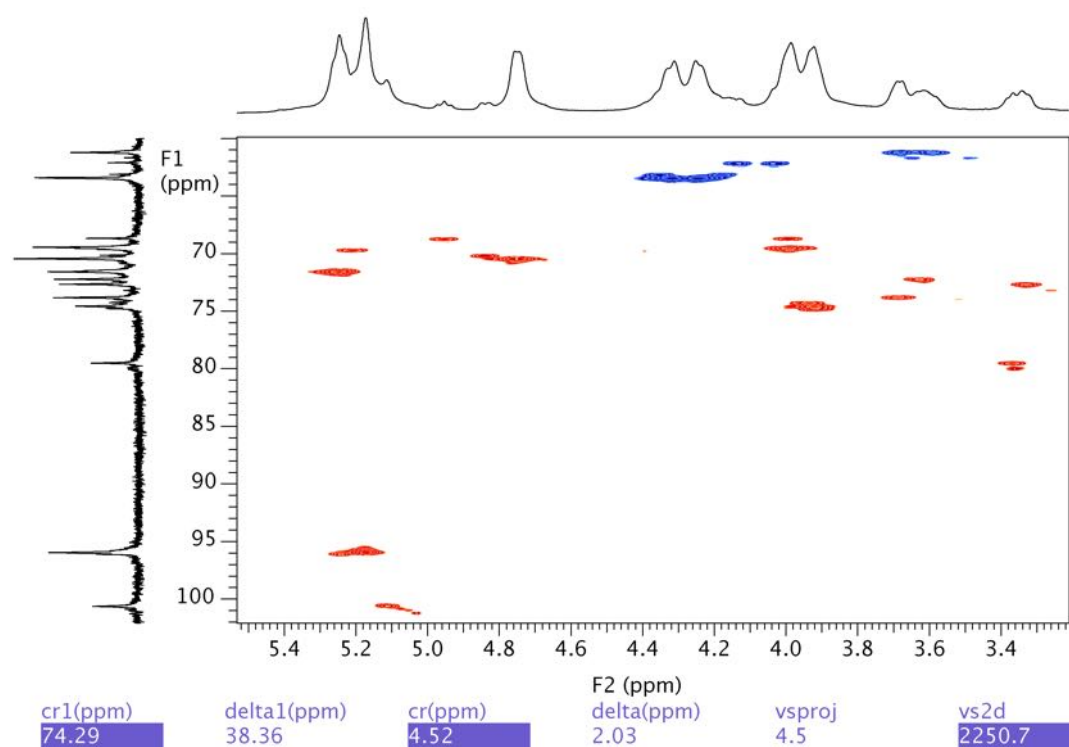


**Figura.S2** Complejos de triyoduro de amilosa (izquierda) y triyoduro de amilopectina (derecha)

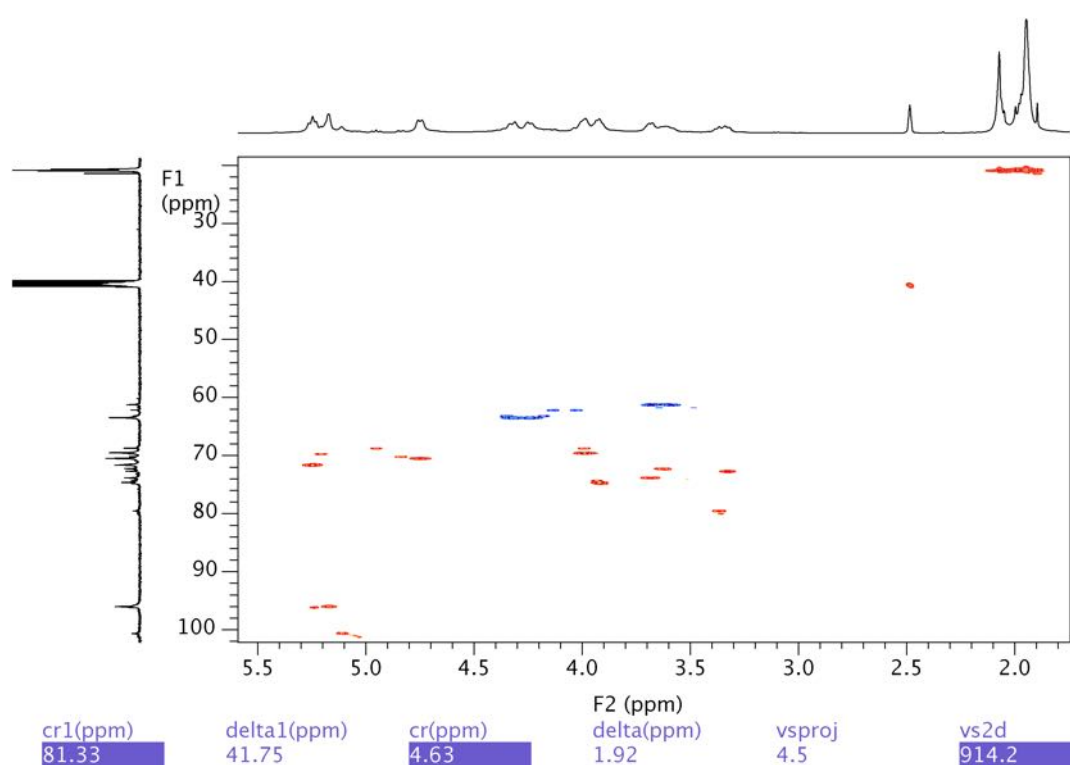
**2D-RMN de almidón de mandioca nativo y acetatos de almidón de mandioca (CSA30, CSA90 y CSA120)****Figura S3.** gCOSY a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CS**Figura S4.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CS



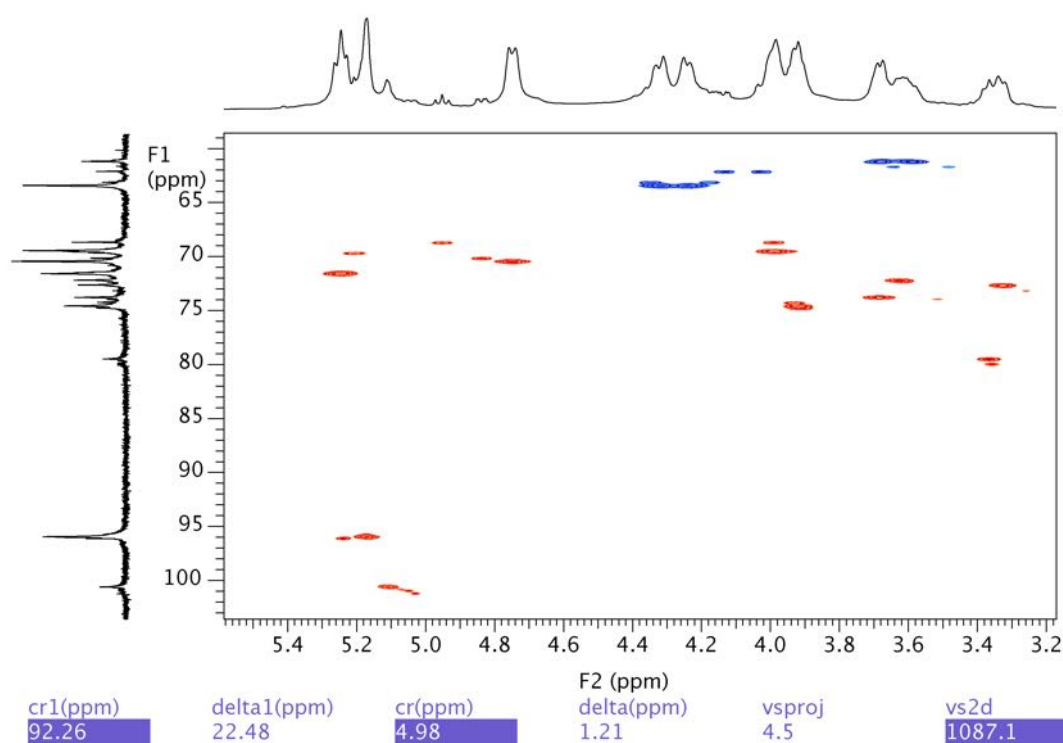
**Figura S5.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de CSA30 (espectro completo)



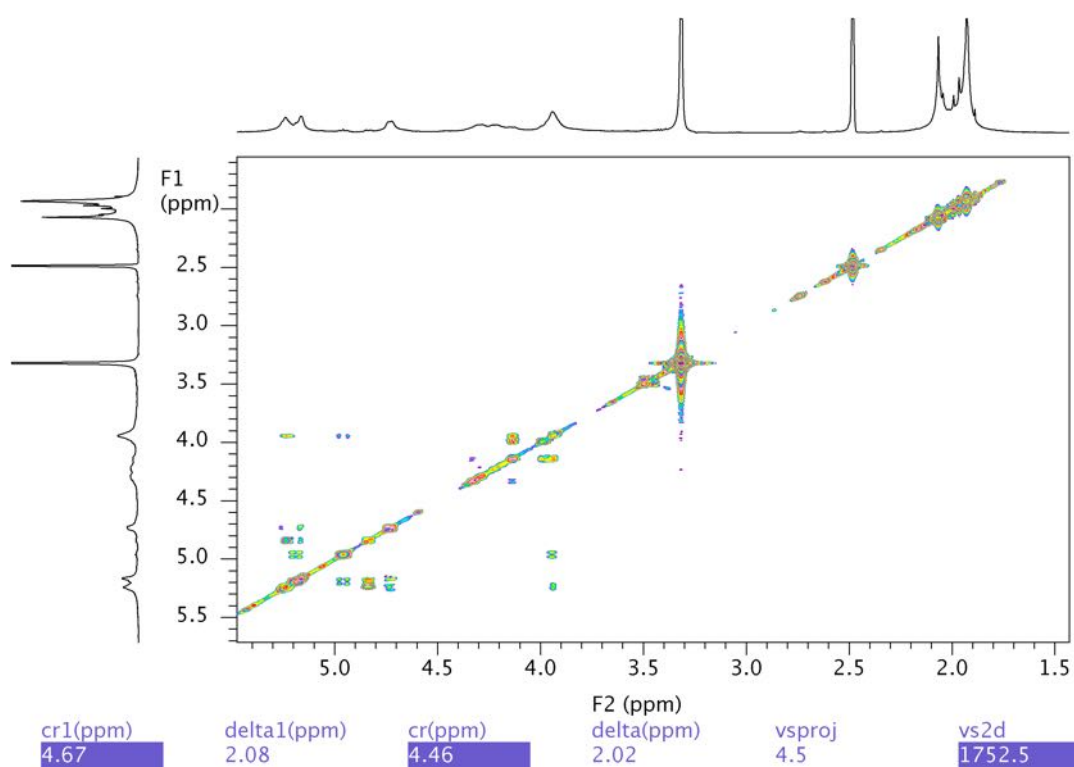
**Figura S6.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de CSA30 (espectro expandido)



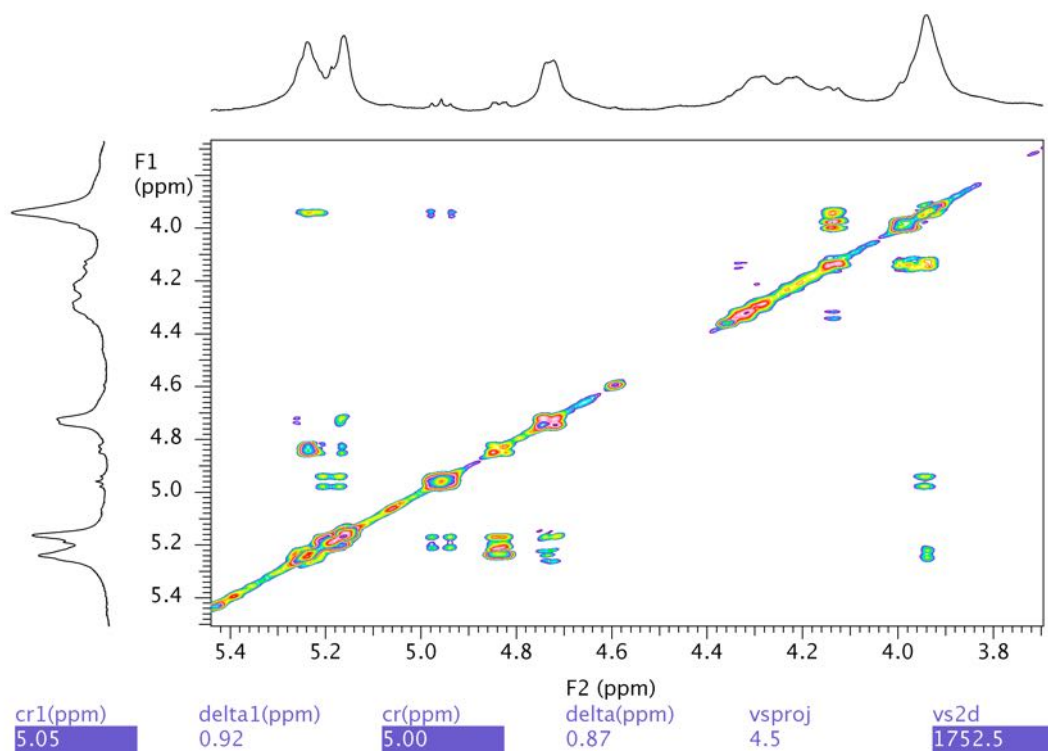
**Figura S7.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de CSA90 (espectro completo)



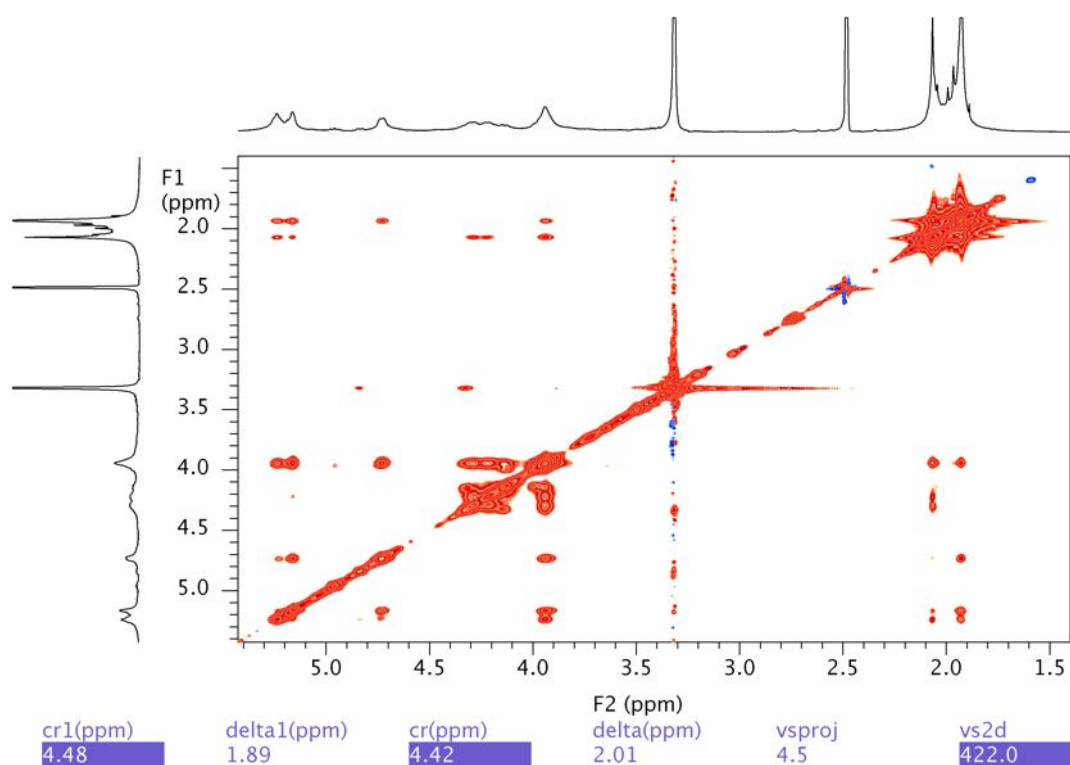
**Figura S8.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de CSA90 (espectro expandido)



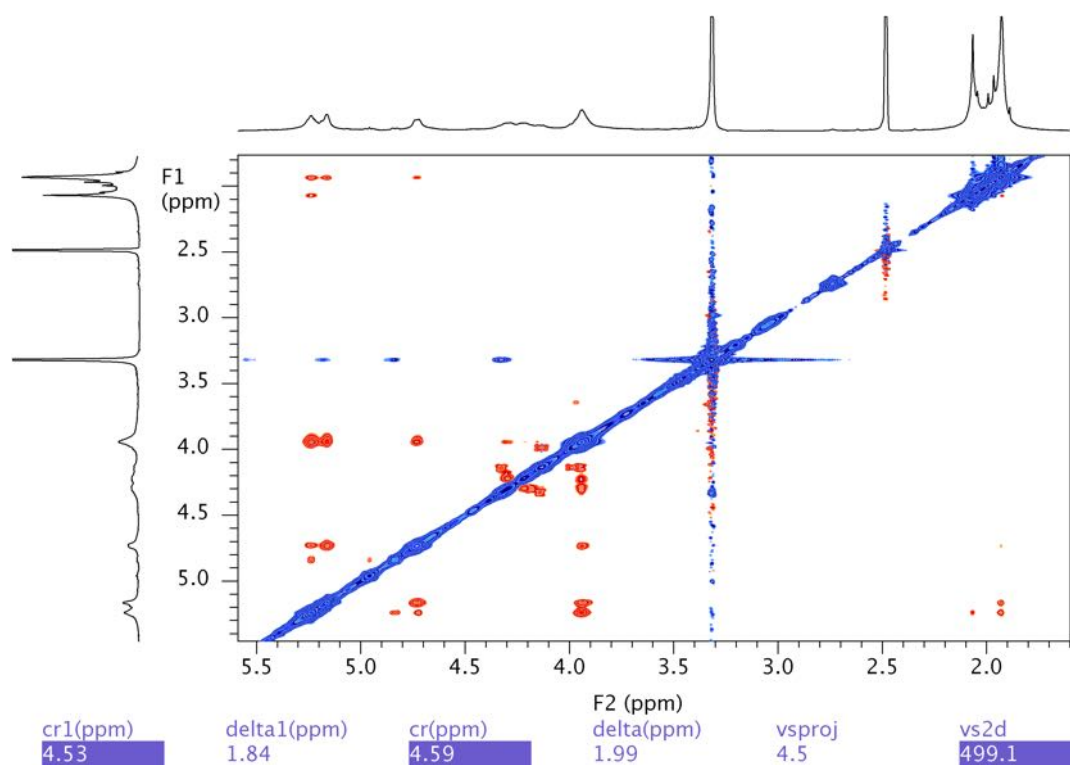
**Figura S9.** gCOSY a 25 °C en DMSO-*d*<sub>6</sub> de CSA120 (espectro completo)



**Figura S10.** gCOSY a 25 °C en DMSO-*d*<sub>6</sub> de CSA120 (espectro expandido)

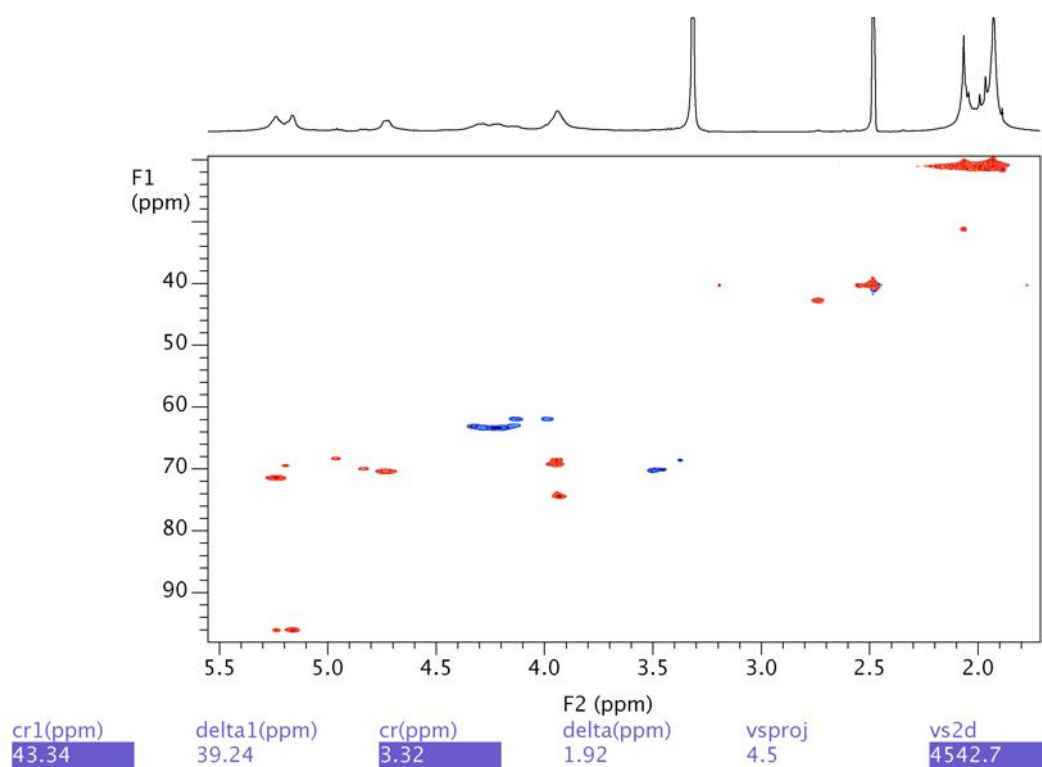


**Figura S11.** zTOCSY a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

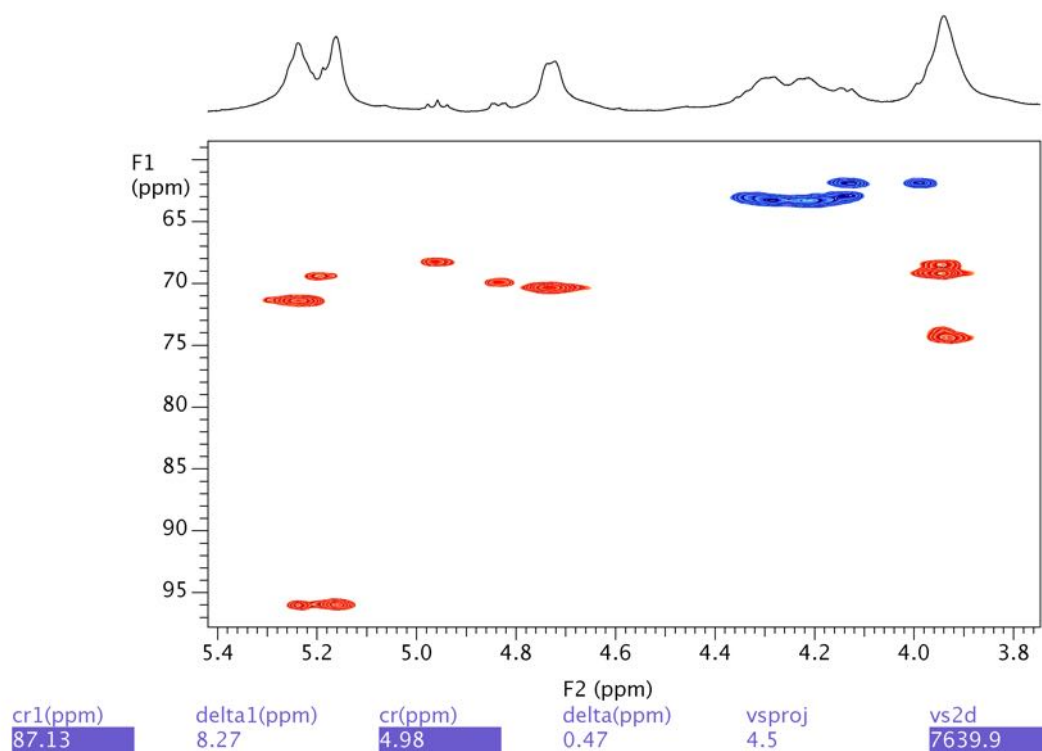


**Figura S12.** ROESY a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

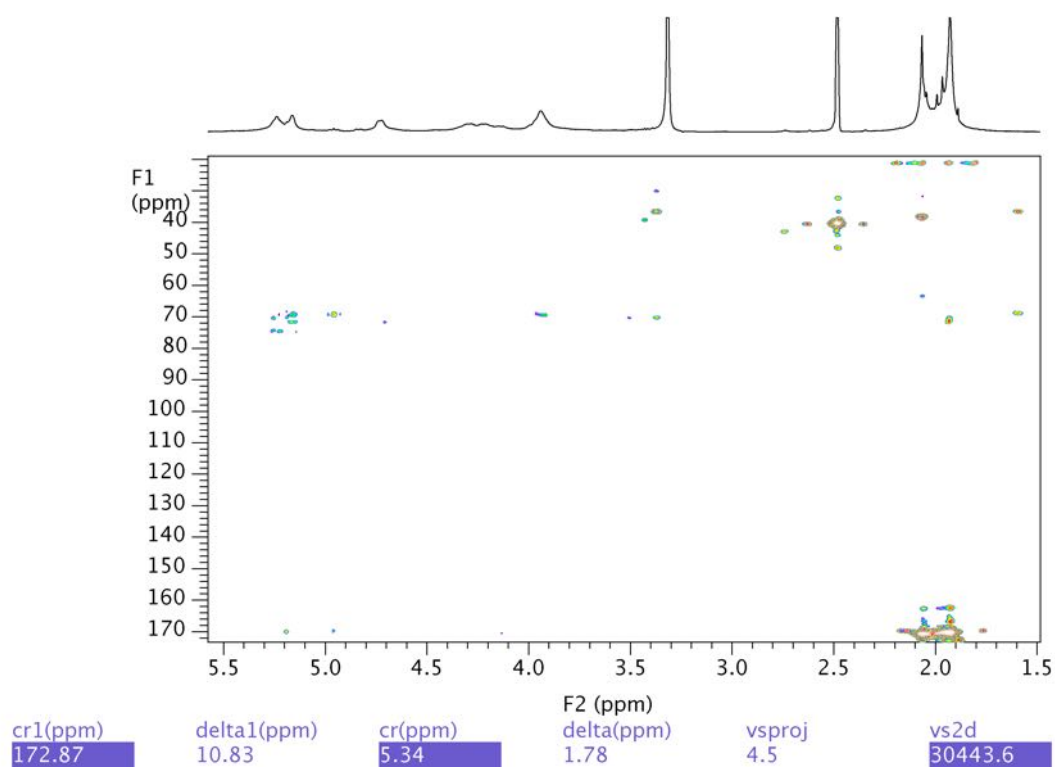




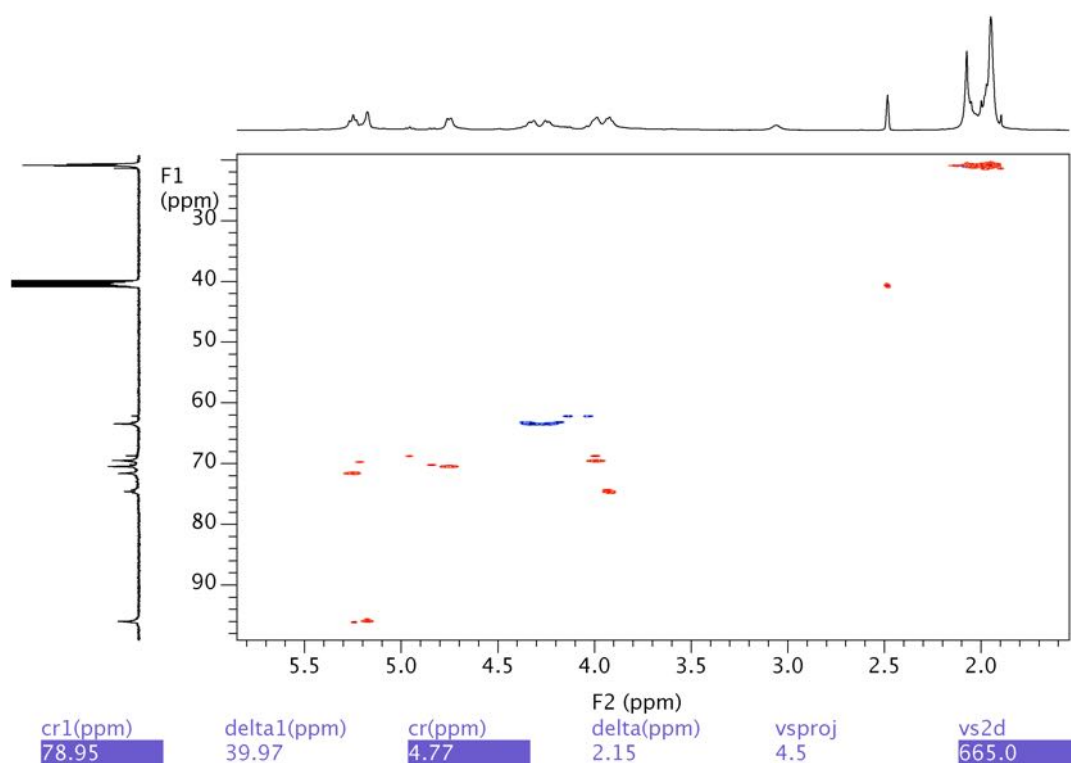
**Figura S13.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)



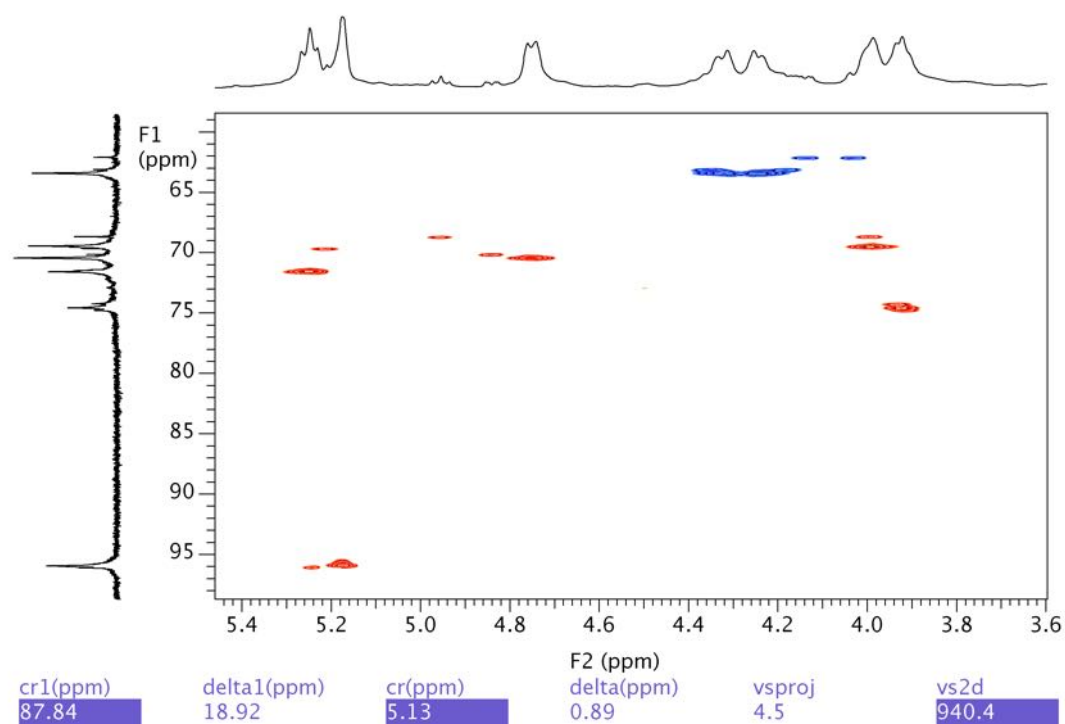
**Figura S14.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro expandido)



**Figura S15.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC a 25 °C en  $\text{DMSO}-d_6$  de CSA120 (espectro completo)



**Figura S16.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en  $\text{DMSO}-d_6$  de CSA120 (espectro completo)



**Figura S17.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en  $\text{DMSO-}d_6$  de CSA120 (espectro expandido)

**RESUMEN DE TABLAS Y FIGURAS****Figuras:***Capítulo 1*

**Figura 1.1** Molécula de Amilosa.

**Figura 1.2** Molécula de Amilopectina.

**Figura 1.3** Planta industrial almidón de mandioca

**Figura 1.4** Molécula de glicerol

**Figura 1.5** Molécula de DSA

**Figura 1.6** Curvas para materiales poliméricos: A-Polímeros Frágiles, B-Materiales Plásticos (similar a los metales), C-Elastómeros

**Figura 1.7** Patrones de difracción A, B, C y V de los almidones nativos

**Figura 1.8** Termográmia diferencial (curva superior, eje derecho) y convencional (curva inferior, eje izquierdo) (Skoog, Holler, & Crouch, 2007)

**Figura 1.9** Esquema de cada uno de los experimentos bidimensionales siendo  $X = {}^{13}\text{C}$

*Capítulo 2*

**Figura 2.1** Reacción química de acetilación en medio ácido

**Figura 2.2** Síntesis de acetato de alto grado

**Figura 2.3** Estructura del almidón nativo de Mandioca

**Figura 2.4**  ${}^1\text{H}$ -RMN, en DMSO a 70 °C de almidón nativo de Mandioca con y sin TFA- $d_1$

**Figura 2.5** Asignación de picos para almidón nativo mediante  ${}^1\text{H}$ -RMN, en DMSO a 70 °C con TFA- $d_1$

**Figura 2.6** a)  ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$  HSQC, en DMSO a 70 °C con TFA- $d_1$  y b) gCOSY para almidón nativo de mandioca.

**Figura 2.7.** a)  ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$  HSQC, en DMSO- $d_6$  a 500 MHz y 70 °C de CSA120

**Figura 2.8** a)  ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$  zTOCSY, en DMSO a 500 MHz y 70 °C de CSA120 b) ROESY en DMSO para 500 MHz a 25 °C para CSA120

**Figura 2.9** a) gCOSY, en DMSO a 500 MHz y 25 °C de CSA120 b)  ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$  HMBC a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120.

**Figura 2.10** Estructura del acetato de almidón de Mandioca.

**Figura 2.11**  $^1\text{H}$ -RMN, en DMSO a 70 °C CSA120 con TFA- $d_1$  y CSA120 sin TFA- $d_1$

**Fig 2.12.**  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) a 70 °C en DMSO- $d_6$  de (a) almidón nativo (con TFA- $d_1$ ); (b) CSA30; (c) CSA90 y (d) CSA120 (b, c y d sin TFA- $d_1$ )

**Figura 2.13**  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) a 70 °C en DMSO- $d_6$  de almidón nativo.

**Figura 2.14**  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) a 70 °C en DMSO- $d_6$  of (a) CS; (b) CSA30; (c) CSA90 and (d) CSA120

**Figura 2.15** ATR/FTIR de almidón nativo de Mandioca

**Figura 2.16** ATR/FTIR de acetilados de almidón de Mandioca de diferentes grado de sustitución

**Figura 2.17** Curvas de TGA de a) CS b) CSA30, c) CSA90, d) CSA120

**Figura 2.18** Curvas de DTG de: a) CS, b) CSA30, c) CSA90, d) CSA120

**Figura 2.19.** Micrografías electrónicas de barrido de Almidón de Mandioca (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)

**Figura 2.20** Micrografías electrónicas de barrido de acetato de Almidón de Mandioca CSA30 (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)

**Figura 2.21** Micrografías electrónicas de barrido de acetato de Almidón de Mandioca CSA90 (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)

**Figura 2.22** Micrografías electrónicas de barrido de acetato de Almidón de Mandioca CSA120 (a) (aumento de 400); (b) (aumento de 1000); (c) (aumento de 2000); y (d) (2000 aumento)

### Capítulo 3

**Figura 3.1** Películas de amilopectina de mandioca

**Figura 3.2** Películas de amilosa de mandioca

**Figura 3.3** Películas de almidón nativo de mandioca

**Figura 3.4** Ganancia de peso para amilopectina T=25 °C, presión de equilibrio 75% HR

**Figura 3.5** Valores de WVTR para una película de amilopectina medida según norma ASTM E-96

**Figura 3.6** Diagrama Tensión- Deformación para películas de almidón, amilosa y amilopectina

**Figura 3.7** Difractogramas de Rayos X para películas de almidón nativo de mandioca, nuevas y con un año de almacenamiento

**Figura 3.8** Difractogramas de Rayos X para películas de amilosa de mandioca, nuevas y con un año de almacenamiento

**Figura 3.9.** Difractogramas de Rayos X para películas de amilopectina de mandioca, nuevas y con un año de almacenamiento.

**Figura 3.10** ATR/FTIR de almidón nativo (gránulos), películas de almidón nuevas y películas de almidón envejecidas

**Figura 3.11** ATR/FTIR ampliación del espectro de a) Películas con 10 días de almacenamiento. b) Películas con 1 año de almacenamiento. c) almidón nativo (gránulos)

**Figura 3.12** ATR/FTIR ampliación del espectro de a) Películas con 10 días de almacenamiento y Películas con 1 año de almacenamiento de amilosa. b) Películas con 10 días de almacenamiento y películas con 1 año de almacenamiento de amilopectina

**Figura 3.13** Termogramas de películas de a) almidón, b) amilosa y c) amilopectina para distintos tiempos de almacenamiento.

**Figura 3.14** Análisis termodiferencial de películas de almidón con diferentes tiempos de almacenamiento. (con 10 días de almacenamiento y envejecidas un año).

**Figura 3.15** Micrografías de películas de almidón nativo de mandioca. a) y b) películas con 10 días de almacenamiento c) y d) con un año de almacenamiento.

**Figura 3.16** Micrografías de películas de amilosa de mandioca. A) y b) películas con 10 días de almacenamiento c) y d) con un año de almacenamiento

**Figura 3.17** Micrografías de películas de amilopectina de mandioca. A) y b) películas con 10 días de almacenamiento c) y d) con un año de almacenamiento

**Figura 3.18** Ensayos cualitativos de biodegradabilidad para películas con 10 días de almacenamiento

**Figura 3.19** a) Películas de CSA DS: 2,9 al 5 % sin plastificante. b) y c) Películas de CSA al 5 % DS:2,9 con 20 % de plastificante al desmoldarla

**Figura 3.20** a), b) y c) Películas de AAM 5% DS 2,8 usando cloroformo como solvente y con 50 % de DSA, al desmoldarla. d) Película luego de dos semanas de almacenamiento

**Figura 3.21** a) Ganancia de humedad de películas de acetato de almidón de alto grado. b) grafica promedio de velocidades de transmisión de agua para película de almidón nativo y almidón acetilado de alto grado de sustitución.

**Figura 3.22** Diagrama Tensión - Elongación de películas de acetato de almidón de mandioca con grado de sustitución de 2,9 y 50% de DSA como plastificante

#### *Capítulo 4*

**Figura 4.1** Película de almidón de mandioca con carga de antimicrobiano (10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina)

**Figura 4.2** Efecto del almacenamiento en ambiente de 50% HR, 25 °C, por siete días de: a) queso sin recubrir, b) queso recubierto con película de almidón control, c) queso recubierto con película de almidón + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, d) queso recubierto con película de almidón + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina

**Figura 4.3** Efecto del almacenamiento en ambiente de 50%RH, 25 °C, por siete días de: a) queso sin recubrir, b) queso recubierto con película de amilosa control, c) queso recubierto con película de amilosa + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, d) queso recubierto con película de amilosa + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina

**Figura 4.4** Efecto del almacenamiento en ambiente de 92%HR, 4 °C, por 20 días de: M0: queso sin recubrir, M1: queso recubierto con película de amilosa control, M2: queso recubierto con película de almidón control, M3: queso recubierto con película de amilosa + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, M4: queso recubierto con película de amilosa + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina. queso recubierto con película de amilosa control, M5: queso recubierto con película de almidón + 1 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina, M6: queso recubierto con película de almidón + 10 mg/dm<sup>2</sup> de natamicina

**Figura 4.5** Efecto del almacenamiento en ambiente de 50%RH, 25 °C, por siete días de quesos recubiertos mediante técnica de inmersión

**Figura 4.6** Peso (%) en muestras de queso almacenadas 4 °C y 92 % HR

**Figura 4.7** Peso (%) en muestras de queso almacenadas 4 °C y 75 % HR

**Figura 4.8** Peso (%) en muestras de queso almacenadas 4 °C y 35 % HR

**Figura 4.9** Peso (%) en relación al agregado del componente activo para 92% HR

**Figura 4.10** Peso (%) en relación al agregado del componente activo para 75% HR.

**Figura 4.11** Peso (%) en relación al agregado del componente activo para 35% HR.

**Figura 4.12** Peso (%) en muestras de queso recubiertas por inmersión, almacenadas 4 °C y 75 % HR.

**Figura 4.13** Recuento total de hongos y levaduras durante el período de almacenamiento de queso regional tipo barra.

**Figura 4.14** Recuento total de bacterias psicrótróficas durante el período de almacenamiento de queso regional tipo barra

## Capítulo 5

Anexo: Información Suplementaria.

**Figura S1.** Control de reacción de amilosa y amilopectina.

**Figura.S2** Complejos de triyoduro de amilosa (izquierda) y triyoduro de amilopectina (derecha)

**Figura S3.** gCOSY a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CS.

**Figura S4.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CS

**Figura S6.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CSA30 (espectro expandido)

**Figura S7.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C en DMSO- $d_6$  de CSA90 (espectro completo)

**Figura S8.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C en DMSO- $d_6$  de CSA90 (espectro expandido)

**Figura S9.** gCOSY a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

**Figura S10.** gCOSY a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro expandido)

**Figura S11.** zTOCSY a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

**Figura S12.** ROESY a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

**Figura S13.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

**Figura S14.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro expandido)

**Figura S15.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC a 25 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

**Figura S16.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro completo)

**Figura S17.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC a 70 °C en DMSO- $d_6$  de CSA120 (espectro expandido)

## Tablas:

## Capítulo 2

**Tabla 2.1.** Valores de DS medidos por titulación para diferentes tiempos de reacción.

**Tabla 2.2** Asignación de señales respectivas a cada núcleo de carbono para almidón de mandioca.

**Tabla 2.3.** Asignación de señales respectivas a cada núcleo de carbono para CSA120.



**Tabla 2.4** DS y posiciones de acetilación relativas calculadas a partir de espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR.

### Capítulo 3

**Tabla 3.1.** Humedad de películas de almidón de mandioca nativo, amilosa y amilopectina almacenadas durante 1 año y para películas nuevas (tiempo 0).

**Tabla 3.2.** Solubilidad de películas a 25 °C en agua y a 37°C en HCl 0,1M para películas de almidón, amilosa y amilopectina.

**Tabla 3.3.** Valores de Permeabilidad y Velocidad de Transmisión al Vapor de Agua en celdas de 0% HR interno, expuestas a condiciones ambientales 75% HR y 25°C.

**Tabla 3.4.** Propiedades mecánicas medidas para película de almidón nativo, amilosa y amilopectina.

**Tabla 3.5.** Contenido de humedad y fracción cristalina de las películas a diferentes tiempos de almacenamiento.

**Tabla 3.6.** Medidas de Permeabilidad, WVTR y espesores promedios para películas de AAM de alto grado de sustitución y plastificante.

**Tabla 3.7.** Solubilidad en agua a 25 y 37 C y en HCl 0.1M 25 y a 37 C de películas de acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución.

**Tabla 3.8** Resumen de principales propiedades de las películas estudiadas.

### Capítulo 4

**Tabla 4.1.** Diseño de experimental para ensayos de pérdida de peso y humedad e influencia de la temperatura en el desarrollo de microorganismos.

**Tabla 4.2** Cronograma de muestreo

**Tabla 4.3** Contenidos de humedad promedio de quesos almacenados a 92% HR y 4 °C.

**Tabla 4.4.** Registro de recuentos totales de hongos y levaduras (log CFU/g) de las muestras de queso con y sin recubrimientos durante el almacenamiento a 4 ° C.

**Tabla 4.5.** Registro de recuentos totales de bacterias psicrotróficas (log CFU/g) de las muestras de queso con y sin recubrimientos durante el almacenamiento a 4 ° C.

**TRABAJOS CIENTÍFICOS GENERADOS A PARTIR DEL TRABAJO DE  
TESIS**

---

## **Preparation and Characterization of Cassava Starch Acetate with High Substitution Degree.**

Pamela Cuenca<sup>a\*</sup>, Sergio Ferrero<sup>b</sup>, Oscar Albani<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratorio de Preservación y Envases/ Instituto de Materiales de Misiones UNaM- CONICET, Félix de Azara 1552, CP: N3300LQD, Misiones Argentina.

<sup>b</sup>GIR MIOMeT, IU CINQUIMA/ Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, E-47011 Valladolid, Spain.

\*Corresponding author. Bchm. Pamela Cuenca. Tel.: +54 0376154239719. E-mail address: pamcuenca@fceqyn.unam.edu.ar; pamcuenca@gmail.com (P. Cuenca).

### **Abstract:**

In this work, cassava starch (CS) was acetylated by a simple and scalable method to produce a highly hydro- phobic polymeric material with potential use in coating and food packaging. The chemical structure, thermal stability and morphological properties of cassava starch acetate (CSA) were determined. Their formation was confirmed using FTIR by the presence of the carbonyl signal around 1749 cm<sup>-1</sup>. Degrees of substitution (DS) obtained by titration were between 1.9 and 2.9.

Thermogravimetric analysis showed an increase in thermal stability with acetylation, the DS 1/4 2.9 sample behaving as a homopolymer. SEM micrographs showed the loss of the structure of the starch granule and the appearance of a beehive-shaped new structures. 1

CS and CSA were structurally characterized by NMR. The CS branching percentage obtained by H NMR was 4.76. Using quantitative <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR the DS was calculated, confirming the values already obtained and the regioselective substitution pattern was determined, demonstrating that the favorite position of acetylation is that of C6

Keywords:

Starch acetate- High degree substitution NMR- Cassava starch- Degree of branching

**Publicado en la Revista Food Hydrocolloids-vol100**

**0268-005X/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.**

**<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105430>**

Recibido el 12 de agosto de 2019; Recibido en forma revisada el 7 de octubre de 2019;

Aceptado el 7 de octubre de 2019

Disponible en línea el 9 de octubre de 2019

## **Películas y materiales compuestos basados en almidón de mandioca acetilado de alto grado de sustitución**

Cuenca, Pamela S. <sup>(1)</sup>\*, Ramallo, Laura A. <sup>(1)</sup>, Albani, Oscar A. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio de Preservación y Envases/ Instituto de Materiales de Misiones UNaM-CONICET, Félix de Azara 1552, CP: N3300LQD, Misiones Argentina.

\*Corresponding author. Bchm. Pamela Cuenca. Tel.: +54 0376154239719. E-mail address: pamcuenca@fceqyn.unam.edu.ar; pamcuenca@gmail.com

### **Resumen**

En este trabajo se desarrollaron películas de acetato de almidón de mandioca (AAM) de alto grado de sustitución ( $DS = 2,9$ ) y materiales compuestos consistentes de la resina AAM soportada en papel Kraft. Como un paso previo, la síntesis del acetato de alto grado fue llevada a cabo empleando ácido metilsulfónico como catalizador. Se realizó la caracterización de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas obtenidas. Las películas de almidón de mandioca acetilado resultaron homogéneas y continuas, de apariencia plástica, pero frágiles. El agregado de 50% de plastificante permitió obtener películas con buenas propiedades mecánicas (tensión de rotura 17,5 MPa, deformación 8%) pero que, con el almacenamiento, se volvieron cerosas y frágiles. Las películas compuestas de papel Kraft - acetato de almidón de mandioca tienen valores de permeabilidad al vapor de agua menores (hasta el 51%) que los papeles sin tratar, a la vez que sus propiedades mecánicas son mejores (tracción de rotura 33 - 42 MPa y elongación 2 - 4%)

Por lo tanto, el desarrollo de envases biodegradables basados en materiales de almidón acetilado - celulosa parece una buena opción para el reemplazo de envases que no son ambientalmente compatibles.

Palabras claves: Acetato de almidón de mandioca; Alto grado de sustitución; Películas libres; Materiales compuestos.

**Aceptado en la Revista de Ciencia y Tecnología (RECyT) de la Universidad Nacional de Misiones. El 3 de febrero de 2020, a publicarse en el volumen 33.**

**Trabajos en Congresos y Jornadas****Desarrollo y caracterización de películas de amilosa y amilopectina de mandioca.**

Cuenca PS <sup>(1) (2)</sup>, Ramallo LA <sup>(1) (2)</sup>, Albani OA <sup>(1) (2)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto de Materiales de Misiones CONICET-UNaM. Posadas, Misiones. Argentina.

<sup>(2)</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Posadas, Misiones. Argentina.

***VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016).***

**Synthesis and Characterization of Cassava Starch Acetates with High Degree of Substitution.**

Pamela Cuenca<sup>1</sup>, Lucas Guz<sup>2</sup>, Lucia Famá<sup>2</sup>, Oscar Albani<sup>1</sup>, Silvia Goyanes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Preservación y Envases / Instituto de Materiales de Misiones UNaM -CONICET Argentina

<sup>2</sup> Dep. Física / IFIBA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

**Resumen y Póster presentados en el XVI Latin-American Polymer Symposium (SLAP 2018), XIV Iberoamerican Polymer Congress (CIP 2018) Mar del Plata, Argentina, 6<sup>th</sup> – 9<sup>th</sup> November 2018**

**Amilosa y amilopectina de mandioca: desarrollo y caracterización de películas sin plastificantes agregados**

CUENCA, P.; RAMALLO, L.; ALBANI, O...

Argentina. POSADAS. 2019. Libro. Resumen. Jornada. JORNADAS CIENTIFICO TECNOLOGICAS UNAM. Universidad Nacional de Misiones

**Síntesis y caracterización de acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución.**

CUENCA, P.; ATENCIO, S.; JULIAN, L.; RAMALLO, L.; ALBANI, O.

Argentina. POSADAS. 2018. Libro. Resumen. Jornada. JORNADAS CIENTIFICO TECNOLOGICAS UNAM. Universidad Nacional de Misiones

**Acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución como posible material polimérico para la liberación controlada de fármacos.**

CUENCA, P.; BENITEZ, C.; BORSINI, A.; ALBANI, O.

Argentina. POSADAS. 2018. Libro. Resumen. Jornada. JORNADAS CIENTIFICO TECNOLOGICAS UNAM. Universidad Nacional de Misiones

**POYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LOS QUE SE DESARROLLÓ LA TESIS**

---

- **DESARROLLO Y APLICACION DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE ALMIDON DE MANDIOCA NATIVO Y ACETILADO PARA PRESERVAR LA CALIDAD DE FRUTAS TROPICALES-** FCEQyN- UNaM

Fecha: 01-2015 al 12-2017

Director: Albani Oscar A. Co-director: Ramallo Laura A.

- **DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE BOLSAS Y ENVASES FLEXIBLES BIODEGRADABLES A PARTIR DE ALMIDON DE MANDIOCA-** FCEQyN- UNaM

Fecha: 01-2019 al 12-2020

Director: Albani Oscar A. Co-director: Ramallo Laura A.

- **DESARROLLO DE MATERIALES COMPUESTOS BASADOS EN BIOPOLIMEROS DE FUENTES REGIONALES Y ADITIVOS NANOESTRUCTURADOS-** Proyecto de Unidad Ejecutora. IMAM- CONICET-UNaM

Fecha: 12-2018 al 12-2023

Director: Area María Cristina



**BECAS OBTENIDAS EN EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL**

---

- **BECA DOCTORAL INTERNA**

Fecha: 04-2015 al 03-2020

Tipo de beca: Postgrado/Doctorado

Tipo de tareas: Formación académica

Institución de trabajo del becario: INSTITUTO DE MATERIALES DE MISIONES (IMAM) ; (CONICET - UNAM)

Institución financiadora de la Beca:

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET)

Nombre del director: Dr. Oscar Alfredo Albani

Nombre del Codirector: Dra. Laura Ana Ramallo

- **BECA DE MOVILIDAD DOCTORAL**

Fecha: 09-2018 al 02-2019

Tipo de beca: movilidad doctoral

Denominación de la beca:

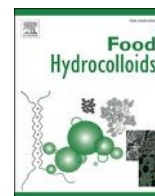
Erasmus+ka107 ICM Movilidad Doctoral

Tipo de tareas: Formación académica incluyendo la realización de tareas de investigación y desarrollo

Institución de trabajo del becario: Facultad de Ciencias- UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (Uva) España

Institución financiadora de la Beca: Erasmus Mundus- Unión Europea

Nombre del director: Dr. Celedonio Álvarez



# Preparation and characterization of cassava starch acetate with high substitution degree

Pamela Cuenca<sup>a,\*</sup>, Sergio Ferrero<sup>b</sup>, Oscar Albani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Preservación y Envases, Instituto de Materiales de Misiones UNaM-CONICET, Félix de Azara 1552, CP: N3300LQD, Misiones, Argentina

<sup>b</sup> GIR MIOMeT, IU CINQUIMA/ Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, E-47011, Valladolid, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Starch acetate  
High degree substitution  
NMR  
Cassava starch  
Degree of branching

## ABSTRACT

In this work, cassava starch (CS) was acetylated by a simple and scalable method to produce a highly hydrophobic polymeric material with potential use in coating and food packaging. The chemical structure, thermal stability and morphological properties of cassava starch acetate (CSA) were determined. Their formation was confirmed using FTIR by the presence of the carbonyl signal around  $1749\text{ cm}^{-1}$ . Degrees of substitution (DS) obtained by titration were between 1.9 and 2.9.

Thermogravimetric analysis showed an increase in thermal stability with acetylation, the DS = 2.9 sample behaving as a homopolymer. SEM micrographs showed the loss of the structure of the starch granule and the appearance of a beehive-shaped new structures.

CS and CSA were structurally characterized by NMR. The CS branching percentage obtained by  $^1\text{H}$  NMR was 4.76. Using quantitative  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR the DS was calculated, confirming the values already obtained and the regioselective substitution pattern was determined, demonstrating that the favorite position of acetylation is that of C<sub>6</sub>.

## 1. Introduction

In recent years, interest in finding ecological alternatives for non-degradable plastic material made of petroleum, has led many researchers to put emphasis on natural polymeric materials of agricultural origin. Starch has been one of the best alternatives because it is a low cost renewable material. Its main drawback is that, in its native state, it is highly sensitive to moisture.

Cassava is a native crop of tropical America. It is cultivated in different regions of America, Asia and Africa. Among starches, cassava stands out for its low price and wide availability in these regions. Several authors investigated the potential use of cassava starch as a polymeric matrix in the films production (Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2005; Seligra, Medina Jaramillo, Famá, & Goyanes, 2016). As a biodegradable polymer material, acetylated starch also has many potential uses in pharmaceutical applications, food industries and other new applications (Zhang, Xie, Zhao, Liu, & Gao, 2009).

The chemical modification of the starch is directly related to the reactions of the hydroxyl groups of the starch polymer. Reactions via ether, formation of esters, oxidation and hydrolysis of hydroxyl groups, are some chemical modifications applicable to starch. Among these,

acetylation can be performed with relative ease to significantly improve the physicochemical and functional properties of starch (Jarowenko, 1986; Singh, Kaur, & McCarthy, 2007).

During the acetylation reaction the three free hydroxyl groups on C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> and C<sub>6</sub> in the starch molecule can be substituted with an acetyl group.

Several methods have been described to achieve the chemical acetylation of starch, of low and medium substitution degree. Some include acetylation with acetic anhydride in basic medium, to obtain low degrees of acetylation, which result in hydrophilic products that are used in the food industry. Ayucitra (2013) used a basic means to prepare starch acetates with DS 0.8–0.21. Shogren (1996) used NaOH as a catalyst to prepare starch acetates with intermediate degrees of substitution. Mark and Mehlretter (1972) developed a method that used NaOH as a catalyst to prepare starch triacetate of intermediate grades, performing the nucleophilic substitution on an unsaturated carbon atom of acetic anhydride, by an addition-elimination mechanism. Shogren (2003) used glacial acetic acid and acetic anhydrous at low reaction volumes to obtain acetates with DS between 0.5 and 2.5, at elevated temperatures (160 °C–180 °C).

A process of acetylation in acid medium, using acetic anhydride and acetic acid in the presence of methyl sulfonic acid as a catalyst (Fig. 1)

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [pamcuenca@fceqyn.unam.edu.ar](mailto:pamcuenca@fceqyn.unam.edu.ar), [pamcuenca@gmail.com](mailto:pamcuenca@gmail.com) (P. Cuenca).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105430>

Received 12 August 2019; Received in revised form 7 October 2019; Accepted 7 October 2019

Available online 9 October 2019

0268-005X/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

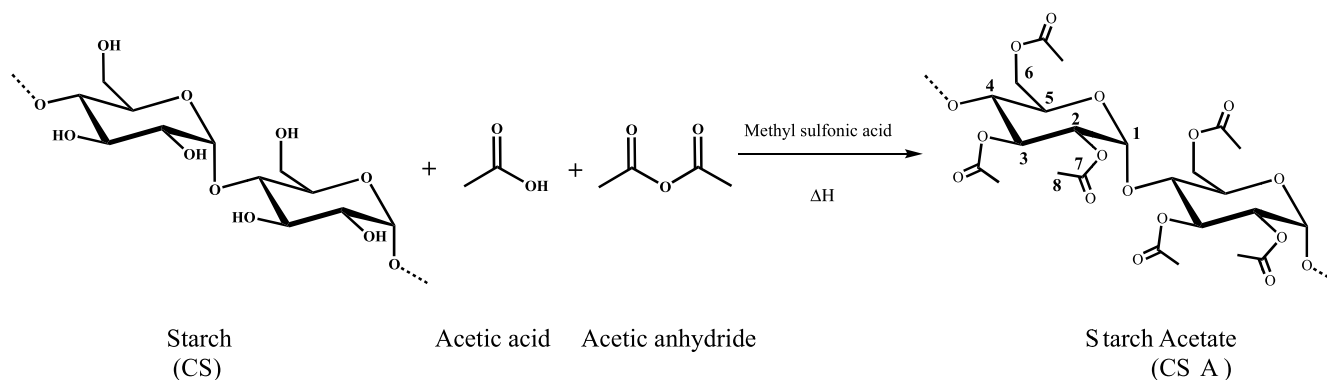


Fig. 1. Chemical reactions of starch acetylation.

was proposed by Feuer (Patent No. 5710269, 1998). This method allows to obtain high degrees of substitution, higher molecular weight and less depolymerization than starch esters produced by other processes, the latter demonstrated using size exclusion chromatography.

Numerous researchers studied the effect of acetylation on the properties of acetates of low and medium degrees of substitution (Colussi et al., 2014; López, Zaritzky, & García, 2010; Mbougung, Tenin, Scher, & Tchiégang, 2012; Osundahunsi, Seidu, & Mueller, 2014; Singh, Kaur, & Singh, 2004; Sodhi & Singh, 2005). Luo and Shi (2018) studied the pattern of substitution of acetyl groups in different starches, varying the concentration of the NaOH catalyst for the same DS. They found that high concentration of catalyst afford to acetylation in both the crystalline and amorphous region of starch.

Chi et al. (2008) studied the acetylation of corn starch in the range of 0.89–2.89, using  $^1\text{H}$  NMR and chemical titration to calculate the DS, obtaining good correlation of results.

Zhang et al. (2009) perform acetylation in acid medium of yellow ginger starch, obtaining DS between 0.09 and 2.67, finding a proportional relationship between the increase in DS and thermal stability of the starch.

Laignel, Bliard, Massiot, and Nuzillard (1997) studied using  $^1\text{H}$  NMR, COSY and HOHAHA experiments, amylose triacetate and acetylated malto-oligosaccharides of DS = 2.63 and DS = 2.74 achieving a complete elucidation of their chemical structures.

Few researches were directed to achieve the synthesis of high DS starches and to investigate the influence of acetylation on the physicochemical and functional properties of starch of different botanical origins and no characterization works have been found specifically of high cassava starch acetate grade.

In this context, the purpose of the present work was to achieve high degrees of acetylation of native cassava starch, by a simple and scalable method in order to obtain a highly hydrophobic compound and to determine the morphological, physicochemical and structural characteristics of the product, which could have applications as alternative (eco-friendly) coating and packaging material.

The properties of the synthesized acetate were studied with an integral approach using different and complementary techniques. Thus, the degree of substitution, the characterization of the chemical structure and the morphology were investigated by chemical analysis, Fourier transform infrared (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), and nuclear magnetic resonance (NMR).

In this manuscript the interest was focused on the complete structural characterization of native cassava starch and starch ester using 1D-NMR and 2D-NMR analysis, this information was not found in the literature. The focus was, unlike other works that use  $^1\text{H}$  NMR, the utilization of quantitative  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR that generates less overlapping of signals, allows a more accurate and detailed calculation of the DS, and provides information on the most favorable position of acetylation. On the other hand, by  $^1\text{H}$ NMR, the degree of branching of native cassava

starch, not reported up to now, was calculated.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Commercial cassava starch was provided by Aldema (Misiones, Argentina), the water was Milli-Q ultrapure water (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA), and acetic anhydride, glacial acetic acid and methanol were of analytical quality purchased from Cicarelli Reagent S. A. (Santa Fé, Argentina), Methyl sulfonic acid was provided by Merck Millipore (Burlington, MA, USA). and DMSO- $d_6$  (99.5% D atom) and TFA- $d_1$  (99% D atom) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) and used as they were received.

### 2.2. Preparation of starch acetate

For the synthesis of high substitution cassava starch acetate, a modification of the method of Feuer (Patent No. 5710269, 1998), was used.

The starch, was previously dried in a vacuum oven at 50 °C overnight. 30 g of it were mixed with 54 mL of acetic anhydride and 55 mL of glacial acetic acid. Then, 0.38 mL of the methyl sulfonic acid esterification catalyst (MSA), diluted in 5 mL acetic acid, was added slowly over a period of 10 min, and subsequently the mixture was heated and maintained between 85 °C and 95 °C by 30, 90 and 120 min. Then cold distilled water (5–6 °C) was added to the solution to stop the reaction and precipitate the starch acetate. The white precipitate obtained was washed 2 times with distilled water and once with methanol, dried in an oven at 40 °C for 24 h and stored in a desiccator at room temperature.

### 2.3. Determination of the degree of substitution by titration

The degree of substitution of starch acetate was determined by back titration using the method of Miladinov and Hanna (2000). An amount of 0.5 g of acetylated starch was placed in a 250 mL vessel with distilled water (50 mL) and the pH was adjusted to 7 with 0.02 N HCl. Then 25 mL of 0.5 N NaOH was added and heated on a hot plate with vigorous stirring until a clear solution was obtained. The excess NaOH was titrated back to pH 7 with HCl 0.02 N. The DS was calculated as Xu, Miladinov, and Hanna (2004):

$$\text{Degree of Substitution} = \frac{162 \cdot (N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} - N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}})}{1000 \cdot W - 42 \cdot (N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} - N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}})} \quad (1)$$

where  $N_{\text{NaOH}}$  was the normality of NaOH,  $V_{\text{NaOH}}$  was the volume of NaOH,  $N_{\text{HCl}}$  was the normality of HCl used to back titrate,  $V_{\text{HCl}}$  was the volume of HCl used to back titrate, and W was the sample weight (g).

## 2.4. Fourier transform infrared spectroscopy

FTIR analyzes were performed using a Jasco FT-IR 4100 spectrometer (Easton, USA) equipped with an attenuated total reflectance module (ATR, ZnSe crystal). Spectra were recorded in a range from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  as the average of 64 scans with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## 2.5. Thermogravimetric analysis

Thermal properties were studied by thermogravimetric analysis DTG-60 Shimadzu instrument (Kioto, Japan). Samples of 5 mg of each powder were placed in aluminum pans in the TGA balance. Tests were performed under nitrogen atmosphere (flow rate of 30 mL/min) from 30 to 450 °C at a heat rate of 10 °C/min. Experiments were carried out in triplicate.

## 2.6. Nuclear magnetic resonance

All the studies of  $^1\text{H}$  experiments were recorded on 500 MHz Agilent instruments, (Santa Clara, USA). The NMR samples of starches were prepared as follows: 15 mg of native starch or modified starch (each sample) was placed into a small vial and 750  $\mu\text{L}$  of  $\text{DMSO}-d_6$  was added and then transferred into a NMR tube. The acquisition parameters were: 70 °C, 10 s relaxation delay between transients, 45° pulse width, spectral width of 8012.8 Hz, a total of 32 transients and 2.044 s acquisition time. All the studies of  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  experiments were recorded on 500 MHz Agilent instruments equipped with OneNMR probe. The NMR samples of starches were prepared as follows: 50 mg of native starch or 125 mg of modified starch (each sample) was placed into a small vial and 750  $\mu\text{L}$  of  $\text{DMSO}-d_6$  was added and then transferred into a 5 mm NMR tube. The acquisition parameters for native starch were: 70 °C, 1 s relaxation delay between transients, 45° pulse width, spectral width of 31,250 Hz, a total of 23,280 transients and 1.048 s acquisition time. In order to obtain quantitative measurement quantitative  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  spectra for modified starch, the inverse gated decoupling technique to suppress the nuclear Overhauser effect (NOE) was used. The acquisition parameters were: 70 °C, 10 s relaxation delay between transients, 60° pulse width, spectral width of 31,250 Hz, a total of 6200 transients and 1.048 s acquisition time.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts ( $\delta$ ) was reported in parts per million (ppm) and referenced to tetramethylsilane (TMS), using the solvent residual peak as an internal reference. The final spectra were manipulated and processed using Mestrelab Research software (MNova 12.0).

## 2.7. Calculation of the degree of branching (DB) and average length of the chain (CLn) by $^1\text{H}$ NMR spectroscopy

The DB, which represents the percentage of branches ( $\alpha$ -1,6 links) with respect to the total number of bonds present in starch, and the average length of the chain (CLn) number of glucose units, can be calculated from the equations described by Nilsson, Bergquist, Nilsson, and Gorton (1996):

$$\text{Degree of branching} = \frac{A(H-1(1 \rightarrow 6)) * 100}{A(H-1(1 \rightarrow 4)) + A(H-1(t)) + A(H-1(1 \rightarrow 6))} \quad (2)$$

$$\text{Average CLn} = A(H-1(1 \rightarrow 4)) + A(H-1(t)) + A(H-1(1 \rightarrow 6)) \quad (3)$$

where  $A(H-1(1 \rightarrow 4))$  represents the area of the signal of anomeric protons involved in the (1–4) linkages of linear chains.  $A(H-1(1 \rightarrow 6))$  represents the area of the signal of anomeric protons involved in a branch point and  $A(H-1(t))$  represent the signal originated by a terminal non-reducing end.

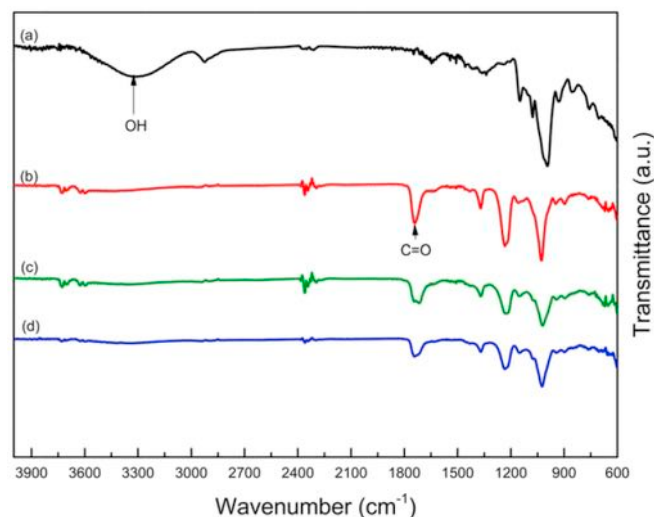
**Table 1**

DS values measured by titration for different reaction times.

Sample	Time of reaction (min)	Calculated DS
CSA30	30	1.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.1
CSA90	90	2.4 <sup>b</sup> $\pm$ 0.2
CSA120	120	2.9 <sup>c</sup> $\pm$ 0.1

Values are averages of triplicate analyses.

Different letters indicate significant differences between values at a 95% confidence level.



**Fig. 2.** ATR/FTIR spectra of (a) CS; (b) CSA120; (c) CSA90; (d) CSA30.

## 2.8. Calculation of the degree of substitution by $^{13}\text{C}$ NMR

The quantitatively evaluable quantitative  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR experiment allows more reliable calculation the DS allowing also a more detailed description of the obtained product, differentiating between the three possible substitution positions available of the anhydroglucose unit, that is, those that occur in carbons C6, C2 and C3.

The partial DS possible in each one of the positions, varies between 0 and 1 and the sum of them constitutes the DS. Obtaining the individual fraction  $X_i$  for each carbon, it is possible to determine the partial DS for each position as:

$$X_i = \frac{A(C_{is})}{A(C_{is} + C_{ius})} \quad (4)$$

where the suffix (s) represents the substituted and the suffix (us) the unsubstituted carbon, and (i) represents the values for C<sub>6</sub>, C<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>.

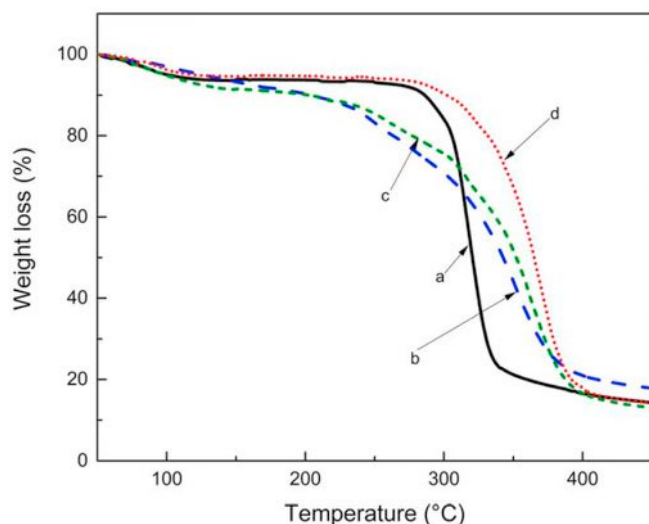
DS is calculated as:

$$DS = X_6 + X_2 + X_3 \quad (5)$$

## 2.9. Scanning electron microscopy

The morphology of native starch and starch acetates were observed using SEM (Hitachi S-3000N, Tokyo, Japan). Prior to the test, the samples were mounted on the SEM heels with double-sided adhesive tapes and then coated with platinum under vacuum for the sample to be conductive at an acceleration voltage of 15 kV. The electronic scanning photomicrographs were recorded with magnifications of 1000 and 2000X.





**Fig. 3.** TGA curves of (a) native cassava starch and starch acetates with (b) DS 1.9, (c) 2.4 and (d) 2.9.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Substitution degrees calculated from chemical titration

By modifying the reaction time variable, CSA with different DS were obtained. The average DS values measured by titration for times between 30 and 120 min are shown in Table 1. The data represent mean values of the triplicate determinations  $\pm$  the standard deviation. DS increases with the reaction time of 30–120 min; however, this increase was non-linear. The data were better represented by an adjustment to a second order equation. This was a consequence of the favorable effect of time on the diffusion and adsorption of the acetyl groups in the starch granule (Khalil, Hashem, & Hebeish, 1995).

#### 3.2. Fourier transform infrared spectroscopy

FTIR spectroscopy was used to verify the change in the chemical structure of the CS molecules resulting from the acetylation reaction. The FTIR spectra of CS and acetylated are shown in Fig. 2.

For the native cassava starch, several characteristic peaks were observed at  $1009\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$  and  $1154\text{ cm}^{-1}$ , attributed to the stretching of the C–O bond. At  $2960\text{ cm}^{-1}$  a peak was observed and attributed to the vibration stretch of the C–H and a broad band between  $3300\text{ cm}^{-1}$  and  $3500\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the vibration of OH group. It was possible to discern a peak at  $1638\text{ cm}^{-1}$  attributable to bound water (Diop, Li, Xie, & Shi, 2011; Xu et al., 2004).

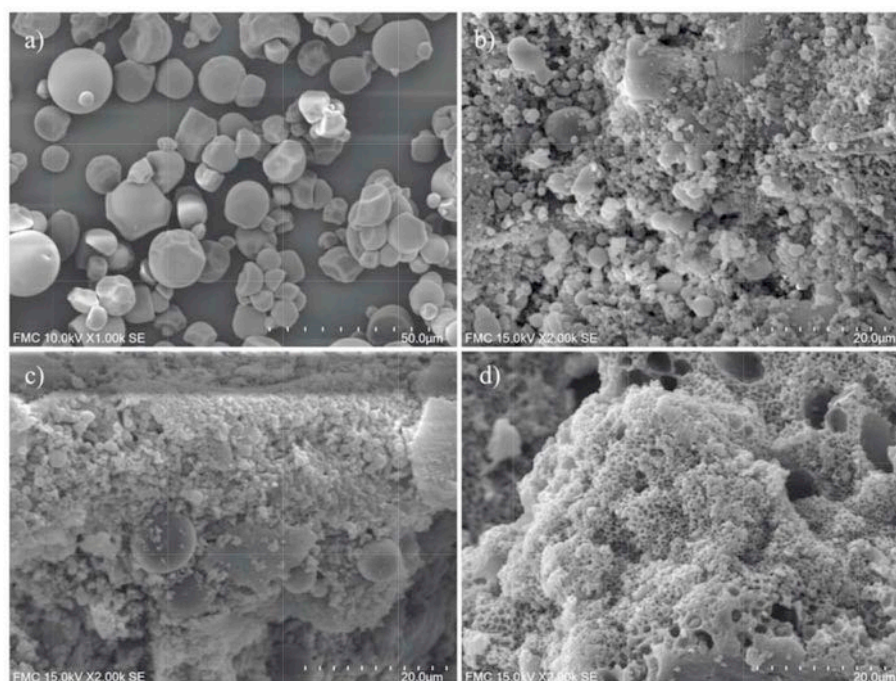
In the spectra corresponding to the acetylated starch, new absorption peaks were observed. At  $1749\text{ cm}^{-1}$  the characteristic peak of C=O was observed (Bello-Pérez, Agama-Acevedo, Zamudio-Flores, Mendez-Montealvo, & Rodríguez-Ambríz, 2010; Diop et al., 2011; Xu et al., 2004). At  $1375\text{ cm}^{-1}$ , a peak attributed to the vibration of methyl symmetrical and in  $1239\text{ cm}^{-1}$  the stretching of the CO bond. The appearance of these new absorption peaks confirms the formation of the acetylated starch, product of the esterification reaction.

On the other hand, the intensity of the peaks increased proportionally to the increase in the degree of acetylation between DS = 1.9 and DS = 2.9. A noticeable decrease of the peaks at  $1009\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$  and  $1154\text{ cm}^{-1}$ , characteristic of the C–O stretching of the native starch could also be observed, as the hydroxyl groups were replaced by the ester.

The bandwidth around  $3400\text{ cm}^{-1}$ , particularly associated with the OH groups, disappears completely for the acetylated starches in the range of DS studied, unlike what is reported by Diop et al. (2011), who finds a gradual decrease of this band until DS = 2.93 for acetylated corn starches.

#### 3.3. Thermogravimetric analysis

When heated, the native starch showed a weight loss in two stages, below  $500^\circ\text{C}$ . The first stages correspond to the loss of water and/or volatile components around  $60\text{--}100^\circ\text{C}$  and the second, to the starch



**Fig. 4.** Scanning electron micrographs of (a) CS (1000 magnification); (b) CSA30 (2000 magnification); (c) CSA90 (2000 magnification); and (d) CSA120 (2000 magnification).

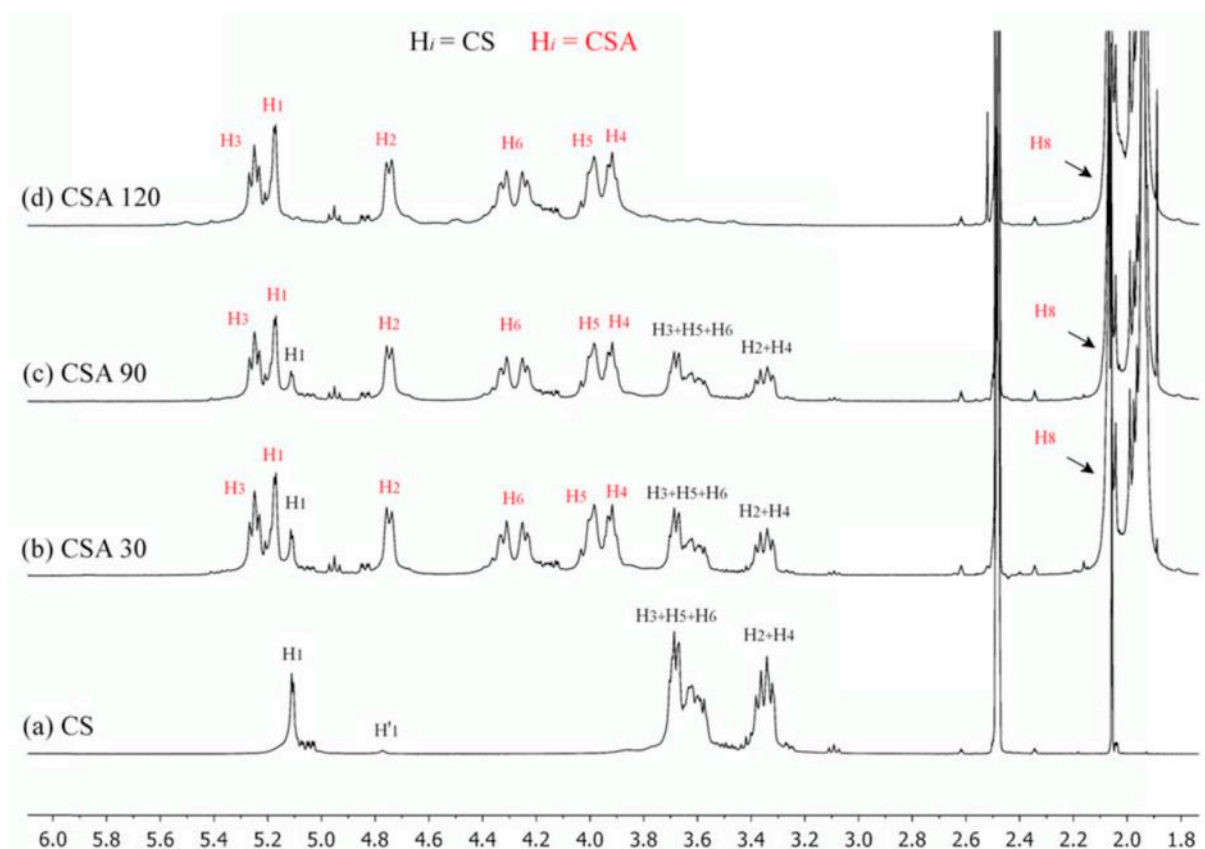


Fig. 5.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) spectra at 70 °C in  $\text{DMSO}-d_6$  with  $\text{TFA}-d_1$  of (a) CS; (b) CSA30; (c) CSA90 and (d) CSA120.

decomposition (Fig. 3). According to DTG curves, this decomposition (the highest) occurred in the range of 272–340 °C.

The samples whose DS were 1.9 and 2.4 also showed weight loss in two stages, the first weight loss occurring between 230 and 280 °C was attributed to the decomposition of the starch, followed by a decomposition of the acetylated starch in the range of 300–391 °C. The lower temperature at which started the decomposition of the starch with intermediate DS, could be attributed to the structural changes that the starch granule experienced during the acetylation reaction. The sample with DS 2.9 showed a single decomposition between 330 and 420 °C with an abrupt drop similar to that of the homopolymers. The increase in thermal stability in this sample (DS 2.9) could be attributed to the low amount of hydroxyl remaining in the starch molecule after acetylation. These results were similar to those obtained for yellow ginger starch (Zhang et al., 2009).

### 3.4. Scanning electron microscopy

Fig. 4 shows the micrographs of the native cassava starch and cassava starch acetate with different degrees of acetylation.

The SEM micrographs of the native starch shows spherical type granules, with smooth surfaces with many of them truncated, tending to form clusters of granules or bunches. The sizes varied between 5 and 15  $\mu\text{m}$ . Similar appreciation was described for cassava starch by Mbougueng et al. (2012).

The acetylation reaction generated the progressive loss of the granule structure, as can be seen in the micrographs of CSA30 and CSA90. During the acetylation reaction, the granules were fragmented and melted to form new structures (fusion) and this process became more evident as the degree of substitution increased. This fusion would be largely a consequence of the introduction of voluminous acetyl groups, which break the internal structure and weaken the granule,

while coalescing them (Diop et al., 2011).

In the CSA120 sample that was highly acetylated, the total fusion of the starch granules and the appearance of the beehive-shaped structure reported by Xu et al. (2004) could be seen. However, the fibrous type structure reported by this author was not observed, this could be attributed to the differences in the botanical origin of the starch studied.

Because the concentrations of acetic anhydride and acetic acid were constant, the differences in the transformations generated in the acetylated starches must be attributed to the reaction time and to the heating to which the respective starches were subjected during the esterification process.

### 3.5. Nuclear magnetic resonance

#### 3.5.1. $^1\text{H}$ NMR spectroscopy

**Characterization of CS:** After the addition of 30  $\mu\text{L}$  of  $\text{TFA}-d_1$  over the sample dissolved in  $\text{DMSO}-d_6$ , the protons belonging to the residual water of the deuterated solvent and OH groups of native starch underwent in fast exchange with the deuterium of  $\text{TFA}-d_1$ , giving rise to a single peak at 10.38 ppm, a result similar to that proposed by Tizzotti, Sweedman, Tang, Schaefer, and Gilbert (2011). Signals of the anomeric protons  $\text{H}_1$  and  $\text{H}_1'$  corresponding to the internal bonds  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 were observed at 5.13 and 4.79 ppm, respectively. The signals corresponding to the anhydroglucose protons of the starch  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_5$  and  $\text{H}_6$  were in the region 3.57–3.76 ppm and the signals of the  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_4$  appeared between 3.32 and 3.44 ppm.

The anomeric protons  $\text{H}_1$  and  $\text{H}_1'$  were well resolved avoiding signal overlapping shifted from other resonances (hydroxyl groups), after the addition of a  $\text{TFA}-d_1$ , allowing a clear integration and reducing the associated error. Therefore, reliable and reproducible calculations of anomeric proton signals could be made.

The DB calculated for the CS used in this work is  $\text{DB} = 4.76 \pm 0.02\%$

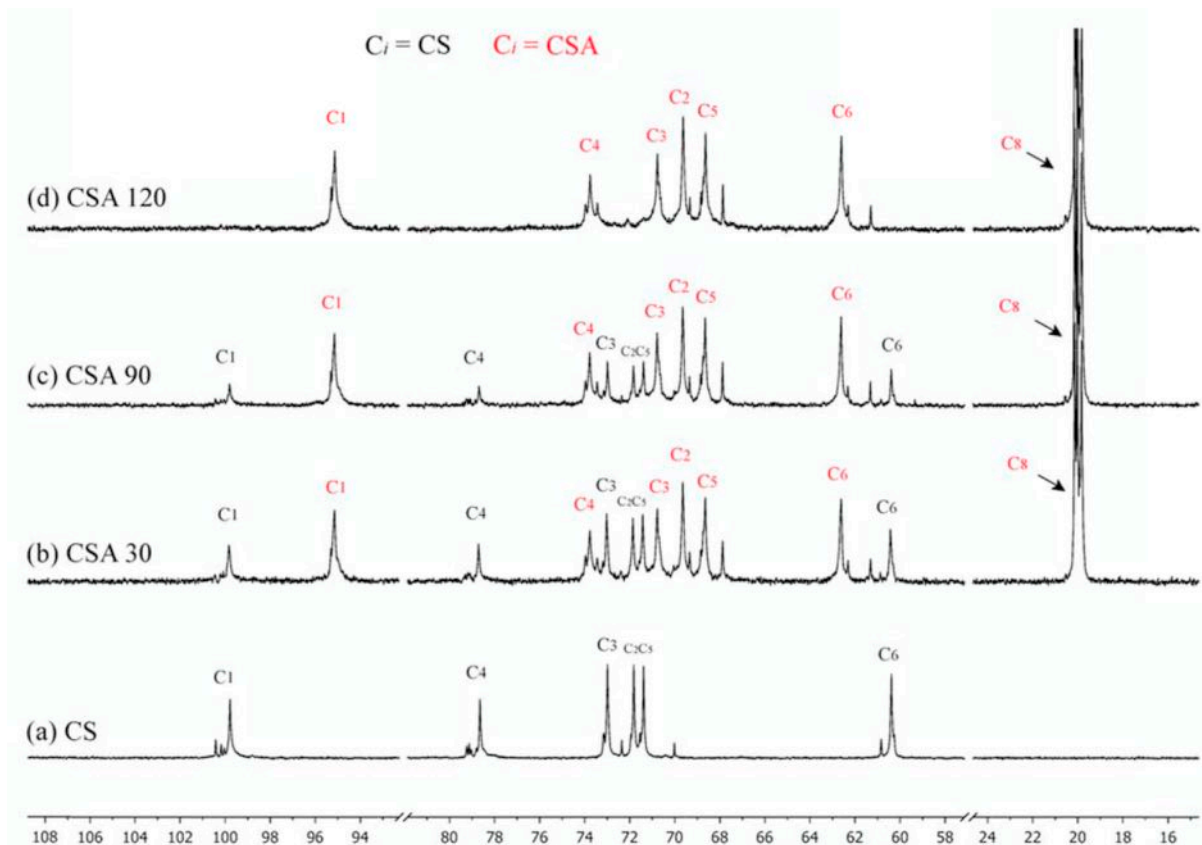


Fig. 6. Spectra at 70 °C in DMSO- $d_6$  of (a)  $^{13}\text{C}$  NMR of CS; and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR of (b) CSA30; (c) CSA90 and (d) CSA120.

and for the average number of glucose units  $\text{CLn} = 21.01$ . These results indicate that it is a highly branched starch. The values obtained in the present work were similar to those reported by Nilsson et al. (1996), for corn and potato amylopectin ( $\text{DB} = 4.07$ ; 4.77 and  $\text{CLn} = 24.6$ ; 21.0), but values for CS were not found in the bibliography.

On the other hand, the ratio of  $\alpha$ -1,4 bonds to  $\alpha$ -1,6 calculated from  $^1\text{H}$  NMR for the case of the native starch studied was 20.01. Dunn and Krueger (1999) found that for cassava starch the value of this ratio is 23.4. Gidley (1985) reported for cassava amylopectin a value of 17.5.

The values of DB or ratio  $\alpha$ -1,4/ $\alpha$ -1,6 generally observed for starches depend on the botanical source, genetic variability and the amylose/amylopectin ratio.

**Characterization of CSA:** By adding TFA- $d_1$  to the acetylated starches dissolved in DMSO- $d_6$ , it was possible to reduce the broadening of some signals assign to interchangeable OH of starch and shift the residual water signal (3.06 ppm) to low field regions (10–14 ppm), but not the simplification of the spectrum as presented by Tizzotti et al. (2011).

This could be attributed to the fact that the DS measured in the present work are high, and in previous studies, acetylated starches of low DS were evaluated.

In Fig. 5, the  $^1\text{H}$  NMR spectra at 70 °C in DMSO- $d_6$  with the addition of TFA- $d_1$  for native starch and acetylated starches are compared. As can be seen in the spectra of samples CSA30 and CSA90, a combination of the spectra of CS and completely acetylated CSA120 is obtained.

The appearance of the signals corresponding to the methyl protons of the acetyl group on starch  $\text{H}_8$  were observed at 1.9–2.1 ppm. Since each peak is an independent entity,  $^1\text{H}$  NMR could be used for the calculation of the DS by integration of peaks as described by De Graaf, Lammers, Janssen, and Beenackers (1995) and Tizzotti et al. (2011), but the complete separation of signals was not achieved (expected after the addition of TFA- $d_1$ ), then it was not possible to use these experiments for the calculation of DS.

Table 2

Assignment of respective signals to each group of carbons for CS and CSA120.

Assignment of carbon signal	chemical shift range (ppm)	
	CS	CSA120
C <sub>1</sub>	100.50–99.30	95.61–94.43
C <sub>2</sub>	72.40–71.66	70.03–69.27
C <sub>3</sub>	73.22–72.80	71.28–70.43
C <sub>4</sub>	79.32–78.33	74.03–73.33
C <sub>5</sub>	71.68–71.09	68.82–68.32
C <sub>6</sub>	60.9–60.06	63.29–62.12
C <sub>7</sub>	–	170.00–168.46
C <sub>8</sub>	–	20.23–19.70

### 3.5.2. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spectroscopy

One advantage offered by  $^{13}\text{C}$  NMR, in contrast of  $^1\text{H}$  NMR spectra which suffer from an extreme signal overlapping, is that it has a large chemical shift range and as result different carbon resonances inside of skeleton (glucose units) could be identified, allowing carbon integration. This fact, through quantitative measurement of  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR, allowed calculation of DS for acetylated starches.

Fig. 6 shows the spectra of  $^{13}\text{C}$ -NMR of native cassava starch and quantitative  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR cassava starch acetate of different DS, at 70 °C in DMSO- $d_6$ .

$^{13}\text{C}$  peak assignments corresponding to CS and CSA was performed by 2D-NMR methods (gCOSY, zTOCSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC).

Table 2 shows the assignment of respective signals to each C for CS and CSA120. The results obtained agree with those reported in the bibliography (Dais, Peng, & Perlin, 1987; Gidley, 1985; Mora-Gutierrez & Baianu, 1991; Nilsson et al., 1996; Zhu, 2017).

The different DS calculated with equation (5) by means of quantitative  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR for the different starch acetates synthesized are



**Table 3**DS and relative acetylation positions calculated from  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR spectra.

Sample	DS	Standard deviation	X <sub>6</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub>
CSA30	1.97	0.020	0.70 <sup>a</sup>	0.61 <sup>b</sup>	0.66 <sup>c</sup>
CSA90	2.27	0.005	0.80 <sup>a</sup>	0.71 <sup>b</sup>	0.76 <sup>c</sup>
CSA120	2.88	0.015	1 <sup>a</sup>	0.88 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>

Values are averages of triplicate analyses.

Different letters in each row indicate significant differences between values at a 95% confidence level.

reported in Table 3. These values were consistent with the determinations made using the titration method and reported earlier (Table 1).

Regarding the most frequent positions of acetylation, it was found that C<sub>6</sub> was more reactive for the method used and more easily acetylated than secondary (C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>), and the most reactive position among secondary was that corresponding to C<sub>2</sub>, repeating this result in all the CSA samples studied in this work.

This coincides with the study by Fedorova and Rogovin (1963) and Xu et al. (2004), who attributed this behavior to the steric hindrance of positions C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, since they are on the inner surface of starch molecules, unlike primary C<sub>6</sub>. On the other hand, the C<sub>2</sub> being closer to the hemiacetal is more acidic and therefore more reactive than C<sub>3</sub>.

However, it differs substantially with those obtained by Heins, Kulicke, Käufer, and Thielking (1998), who reported that the favored position is that of C<sub>3</sub>. The authors of this paper consider that Heins appreciation was a product of the method used, which is based on the calculation of the substitution C<sub>3</sub> comprising the difference between the value of the total DS with the other positions (C<sub>2</sub> and C<sub>6</sub>) and not as a direct calculation of the area of the peaks assigned to C<sub>3</sub>.

#### 4. Conclusions

High degree cassava starch acetate was synthesized from native starch, resulting from esterification reaction a more thermostable polymeric material and producing a radical change in the morphology of the starch granule.

The FTIR spectra of acetylated starches confirmed the formation of the highly substituted ester.

It is important to note that in this work, unlike others, the signal assignments in the NMR spectra of the analyzed materials were verified with the independent correlation spectrum assignments (2D-NMR). In the paper it was shown that NMR spectroscopy could be used as a rapid and accurate tool for the structural analysis of native and acetylated starch. This technique allowed us to establish that cassava starch is highly branched and determine the degree of substitution of acetylated starches, with more precise data, which nevertheless were concordant with those obtained using back titration. In addition, through  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR spectroscopy it was also possible to determine the regioselective substitution pattern, finding that the most favorable acetylation position for cassava starch is C<sub>6</sub>, followed by C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, a statement in which there is no coincidence in the bibliography.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Laboratory of Instrumental Techniques (LTI) Research Facilities, University of Valladolid, for their assistance with the NMR measurements.

And to the Polymers and Composite Materials Laboratory. (LP&MC), Department of Physics FCEyN - IFIBA (CONICET), University of Buenos Aires, for collaborating with FTIR and TGA measurements.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105430>.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105430>.

#### Abbreviations

CS	Cassava Starch
CSA30	acetylated cassava starch prepared for a reaction time of 30 min
CSA90	acetylated cassava starch prepared for a reaction time of 90 min
CSA120	acetylated cassava starch prepared for a reaction time of 120 min
DS	degree of substitution
CLn	Average length of the chain
DB	Degree of branching
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxide deuterated
TFA- <i>d</i> <sub>1</sub>	Trifluoroacetic acid deuterated

#### References

- Ayucitra, A. (2013). Preparation and characterisation of acetylated corn starches. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 3(3), 156–159. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2012.v3.178>.
- Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Zamudio-Flores, P. B., Mendez-Montealvo, G., & Rodríguez-Ambríz, S. L. (2010). Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 43(9), 1434–1440. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.003>.
- Chi, H., Xu, K., Wu, X., Chen, Q., Xue, D., Song, C., et al. (2008). Effect of acetylation on the properties of corn starch. *Food Chemistry*, 106(3), 923–928. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.002>.
- Colussi, R., Pinto, V. Z., El Halal, S. L. M., Vanier, N. L., Villanova, F. A., Marques E Silva, R., et al. (2014). Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.070>.
- Dais, P., Peng, Q. J., & Perlin, A. S. (1987). A relationship between  $^{13}\text{C}$ -chemical-shift displacements and counterion-condensation theory, in the binding of calcium ion by heparin. *Carbohydrate Research*. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80023-X](https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80023-X).
- De Graaf, R. A., Lammers, G., Janssen, L. P. B. M., & Beenackers, A. A. C. M. (1995). Quantitative analysis of chemically modified starches by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19950471205>.
- Diop, C. I. K., Li, H. L., Xie, B. J., & Shi, J. (2011). Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates. *Food Chemistry*, 126(4), 1662–1669. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.050>.
- Dunn, L. B., & Krueger, W. J. (1999). Branching ratios of starch via proton nuclear magnetic resonance and their use in determining amylose/amylopectin content: Evidence for three types of amylopectin. *Macromolecular Symposia*. <https://doi.org/10.1002/masy.19991400119>.
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.024>.
- Fedorova, A. F., & Rogovin, Z. A. (1963). A study of the relative reactivity of the hydroxyl groups of cellulose in esterification in an acidic medium. *Polymer Science U.S.S.R.*. [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(63\)90350-2](https://doi.org/10.1016/0032-3950(63)90350-2).
- Feuer, B. I. (1998). *Patent No. 5710269*. USA: US Patent.
- Gidley, M. J. (1985). Quantification of the structural features of starch polysaccharides by n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research*. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)90009-6).
- Heins, D., Kulicke, W. M., Käufer, P., & Thielking, H. (1998). Characterization of acetyl starch by means of NMR spectroscopy and SEC/MALLS in comparison with hydroxyethyl starch. *Starch - Stärke*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-379X\(199810\)50:10<431::AID-STAR431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-379X(199810)50:10<431::AID-STAR431>3.0.CO;2-F).
- Jarowenko, W. (1986). Acetylated starch and miscellaneous organic esters. In *Modified starches: Properties and uses*.
- Khalil, M. I., Hashem, A., & Hebeish, A. (1995). Preparation and characterization of starch acetate. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19950471005>.
- Laignel, B., Bliard, C., Massiot, G., & Nuzillard, J. M. (1997). Proton NMR spectroscopy assignment of D-glucose residues in highly acetylated starch. *Carbohydrate Research*, 298(4), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)00314-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00314-X).
- López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041>.
- Luo, Z. G., & Shi, Y. C. (2018). Distribution of acetyl groups in acetylated waxy maize starches prepared in aqueous solution with two different alkaline concentrations. *Food Hydrocolloids*, 79, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.015>.
- Mark, A. M., & Mehltretter, C. L. (1972). Facile preparation of starch triacetates. *Starch - Stärke*. <https://doi.org/10.1002/star.19720240302>.
- Mbougueng, P. D., Tenin, D., Scher, J., & Tchiégang, C. (2012). Influence of acetylation on physicochemical, functional and thermal properties of potato and cassava



- starches. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.006>.
- Miladinov, V. D., & Hanna, M. A. (2000). Starch esterification by reactive extrusion. *Industrial Crops and Products*. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00033-3).
- Mora-Gutierrez, A., & Baianu, I. C. (1991). Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of chemically modified waxy maize starch, corn syrups, and maltodextrins. Comparisons with potato starch and potato maltodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf00006a011>.
- Nilsson, G. S., Bergquist, K. E., Nilsson, U., & Gorton, L. (1996). Determination of the degree of branching in normal and amylopectin type potato starch with <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy: Improved resolution and two-dimensional spectroscopy. *Starch Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.19960481003>.
- Osundahunsi, O. F., Seidu, K. T., & Mueller, R. (2014). Effect of presence of sulphurdioxide on acetylation and sorption isotherm of acetylated starches from cultivars of cassava. *Food Chemistry*, 151, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.020>.
- Seligra, P. G., Medina Jaramillo, C., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.041>.
- Shogren, R. L. (1996). Preparation, thermal properties, and extrusion of high-amylose starch acetates. *Carbohydrate Polymers*, 29(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00143-3](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00143-3).
- Shogren, R. L. (2003). Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00305-3).
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.006>.
- Singh, J., Kaur, L., & Singh, N. (2004). Effect of acetylation on some properties of corn and potato starches. *Starch Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.200400293>.
- Sodhi, N. S., & Singh, N. (2005). Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.018>.
- Tizzotti, M. J., Sweedman, M. C., Tang, D., Schaefer, C., & Gilbert, R. G. (2011). New <sup>1</sup>H NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf201209z>.
- Xu, Y., Miladinov, V., & Hanna, M. A. (2004). This article is from the november-december 2004 issue of published by the American association of cereal chemists , inc . Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution 1. *Cereal Chemistry*, 81(December), 735–740.
- Zhang, L., Xie, W., Zhao, X., Liu, Y., & Gao, W. (2009). Study on the morphology, crystalline structure and thermal properties of yellow ginger starch acetates with different degrees of substitution. *Thermochimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.05.019>.
- Zhu, F. (2017). NMR spectroscopy of starch systems. *Food Hydrocolloids*, 63, 611–624. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.015>.

### *Experimental Section*

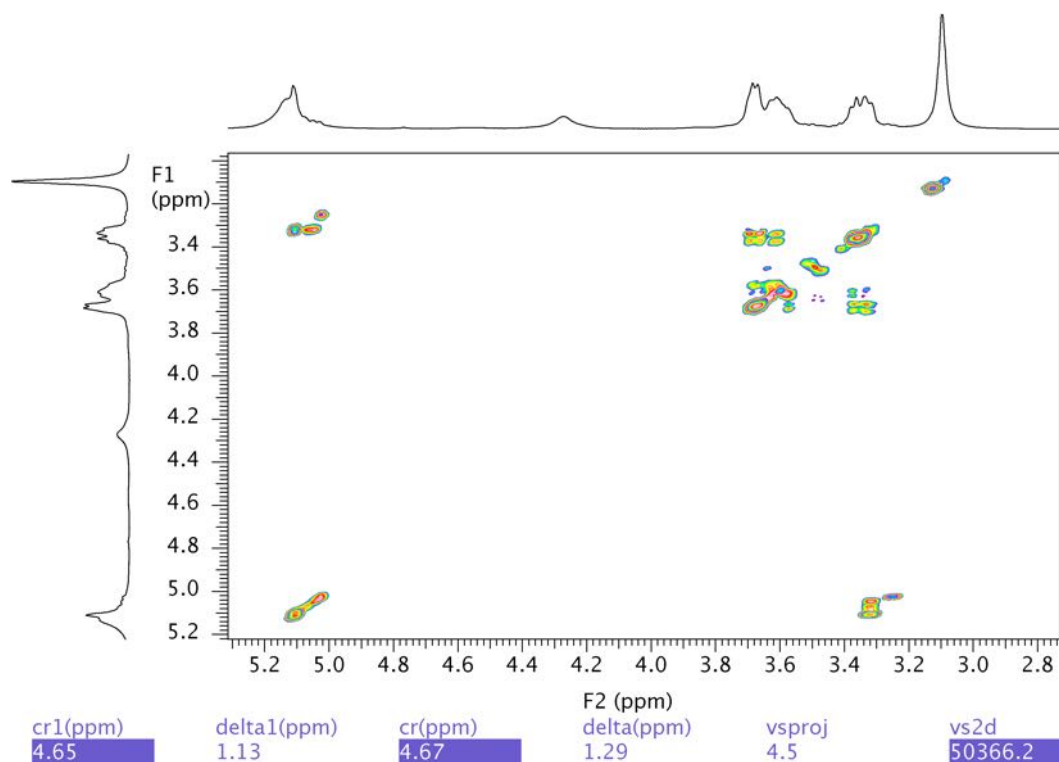
For the synthesis of high substitution cassava starch acetate, a minimal modification of the method of Feuer (Patent No. 5710269, 1998), which proposes a reaction in acid medium with methyl sulfonic acid as a catalyst, was used.

#### General Procedure for preparation of starch acetate with DS = 2,9

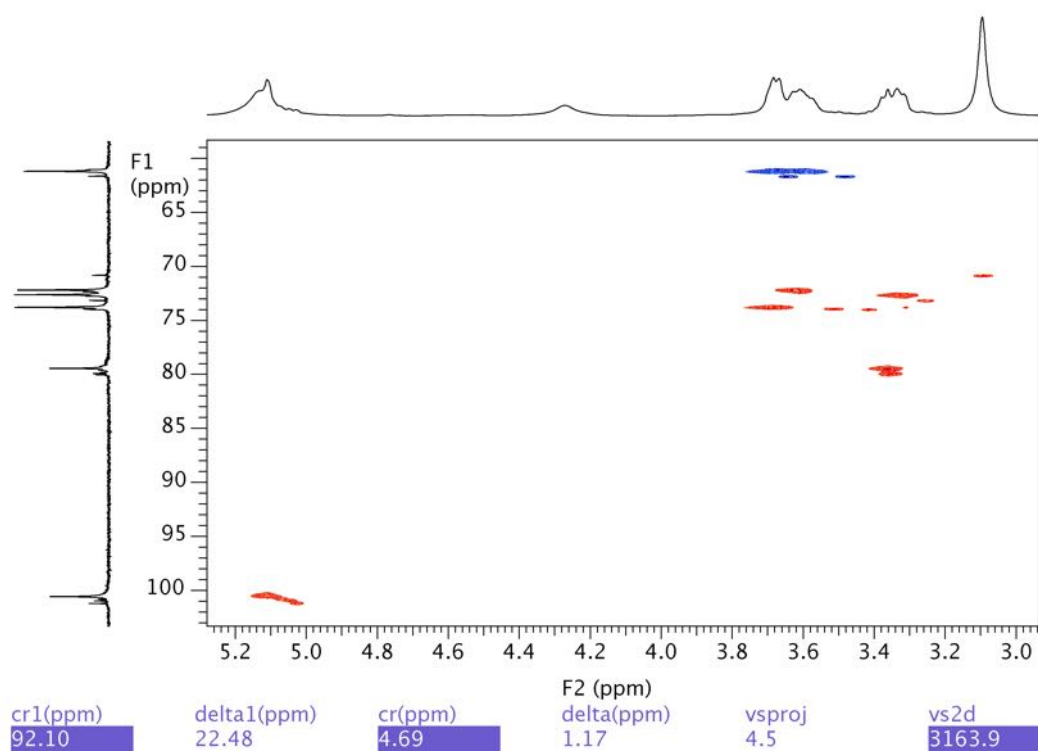
Commercial cassava starch (30 g., 0.18 mol) was previously dried in a vacuum oven at 50 °C overnight, mixed with cold acetic anhydride (5 °C) (54 mL, 0.57 mol) and acid glacial acetic (55 mL, 0.96 mol). The mixture was heated to 40 °C under magnetic stirring and then the reaction catalyst was incorporated: methylsulfonic acid (0.38 mL, 5.85 mmol) previously diluted in acetic acid (5 mL, 0.08 mol), slowly (about 1 mL / min) for a period of 10 minutes. The mixture was kept under constant stirring at a temperature between 85 °C and 95 °C for 120 minutes. After the reaction time had elapsed, cold distilled water (5-6 °C) was added to solution to stop the reaction and precipitate the starch acetate. The white precipitate obtained was washed twice with distilled water and once with methanol, dried in an oven at 40 °C for 24 hours and stored in a desiccator at room temperature. Under these conditions the reaction yield was 85% (45.3g). ATR/FTIR (powder) 1749 and 1375 cm<sup>-1</sup>.

*Supporting Information*

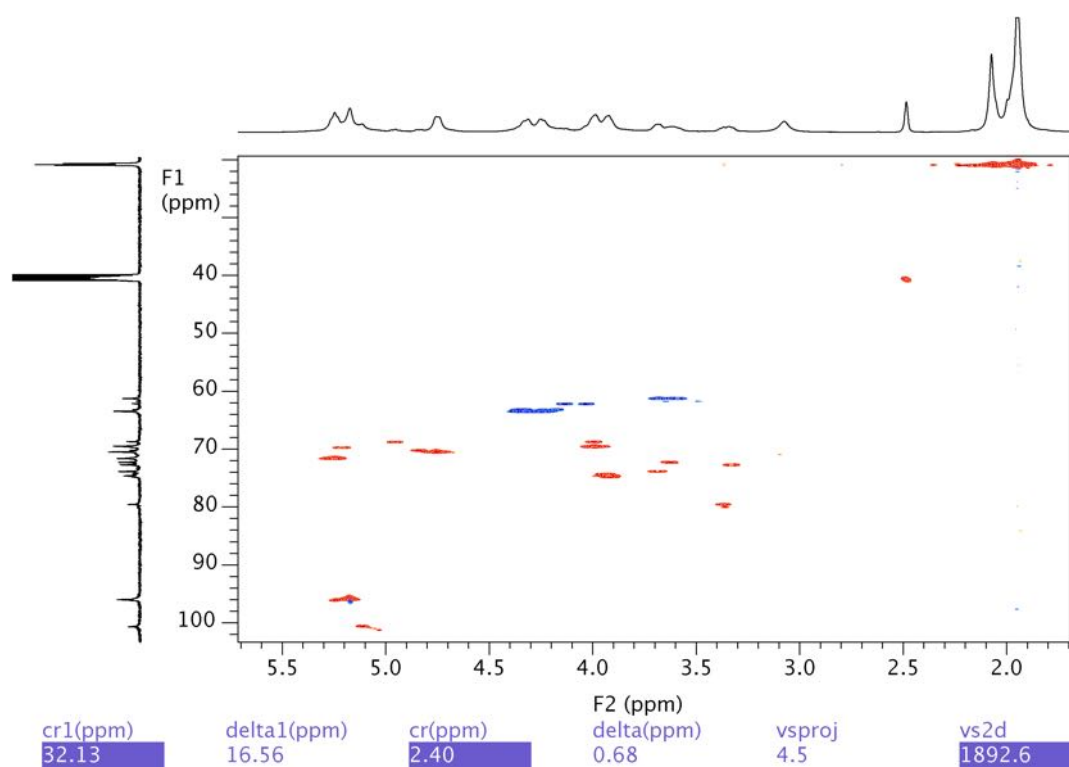
2D-NMR of native cassava starch and cassava starch acetate (CSA30, CSA90 and CSA120)



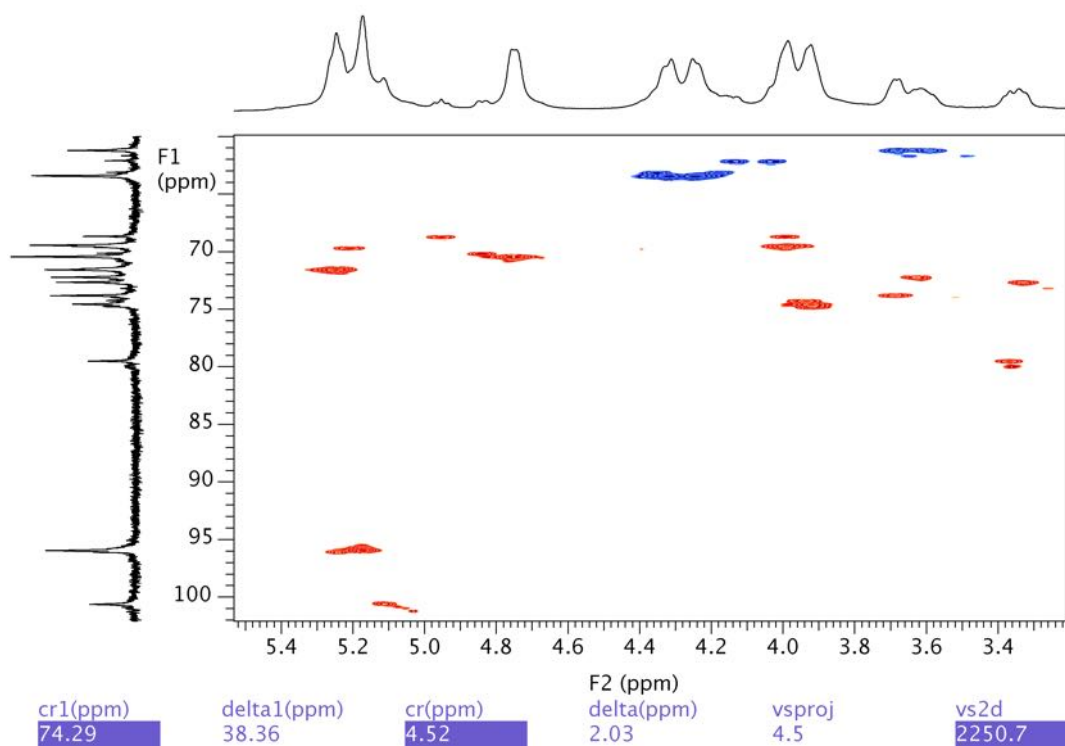
**Fig. 1.** gCOSY at 70 °C in DMSO- $d_6$  of CS.



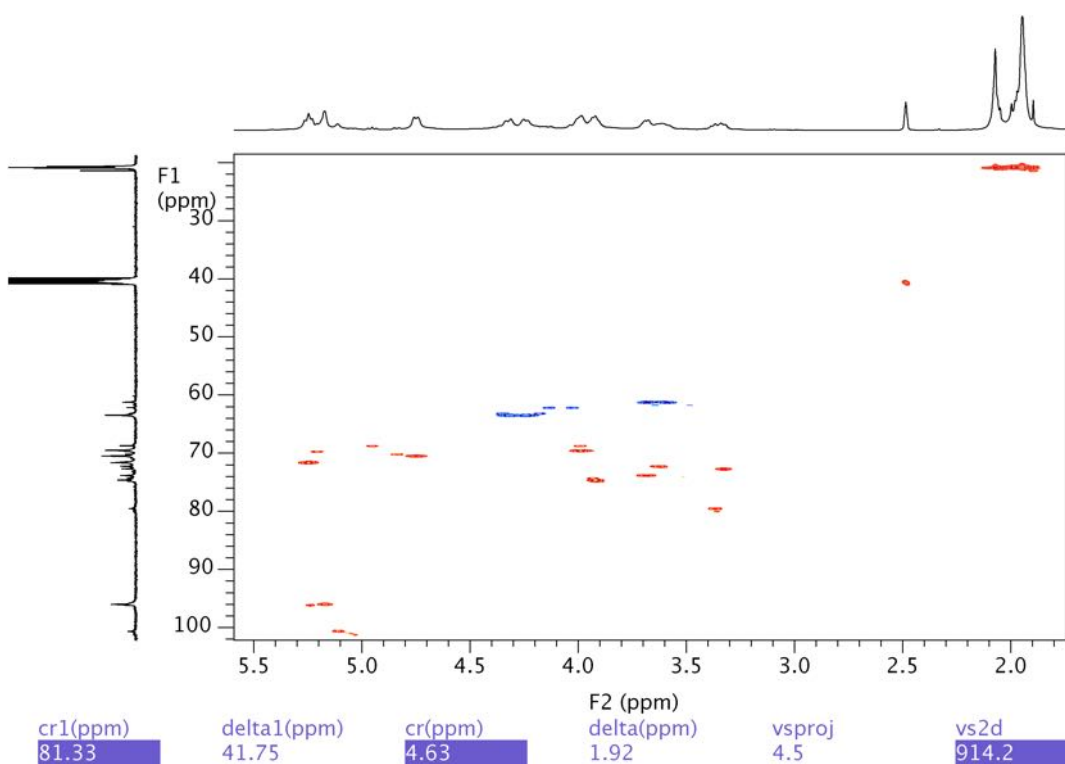
**Fig. 2.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CS.



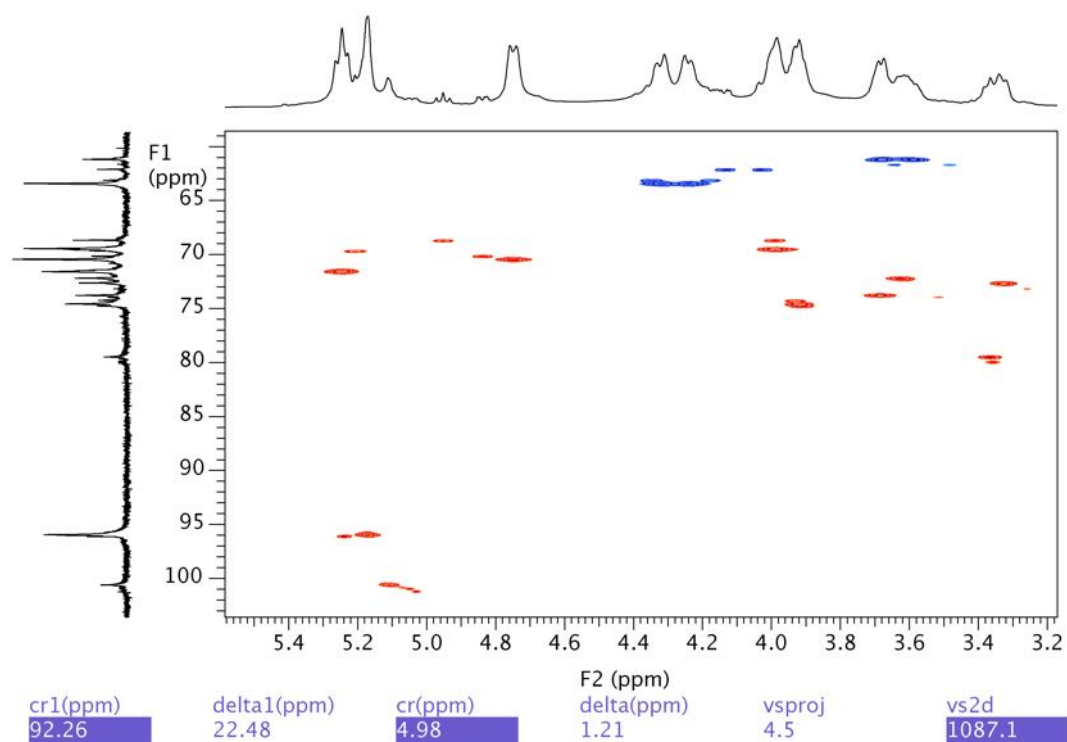
**Fig. 3.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA30 (full spectrum)



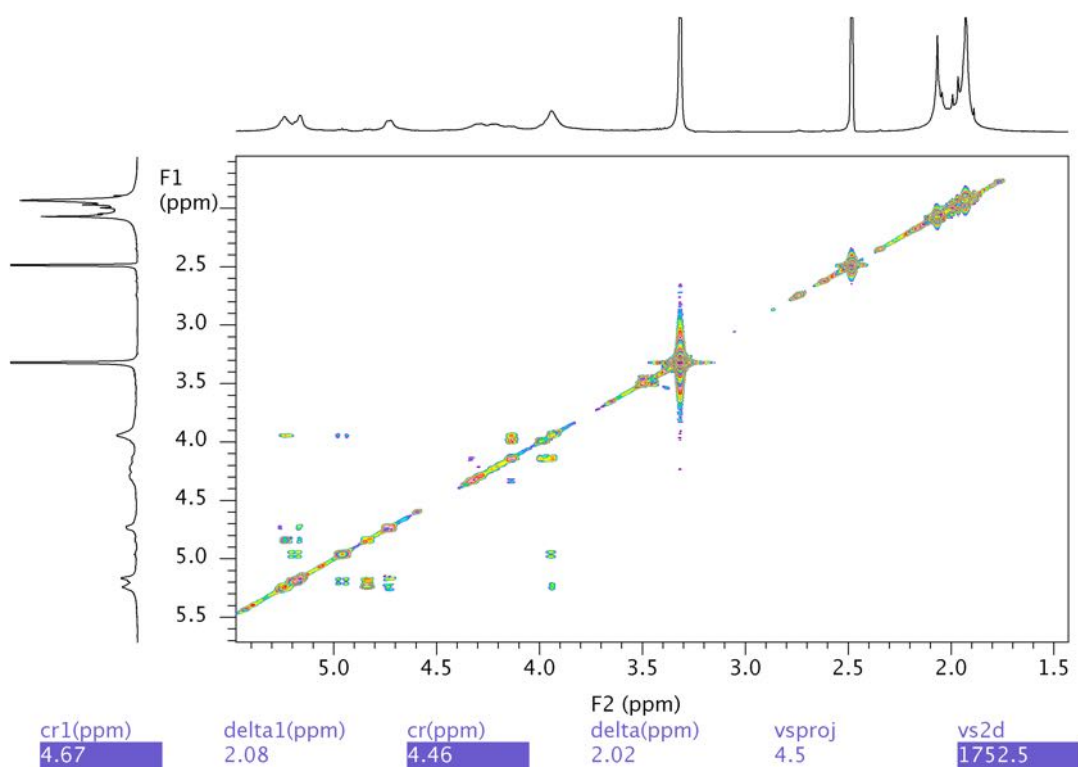
**Fig. 4.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA30 (expansion spectrum)



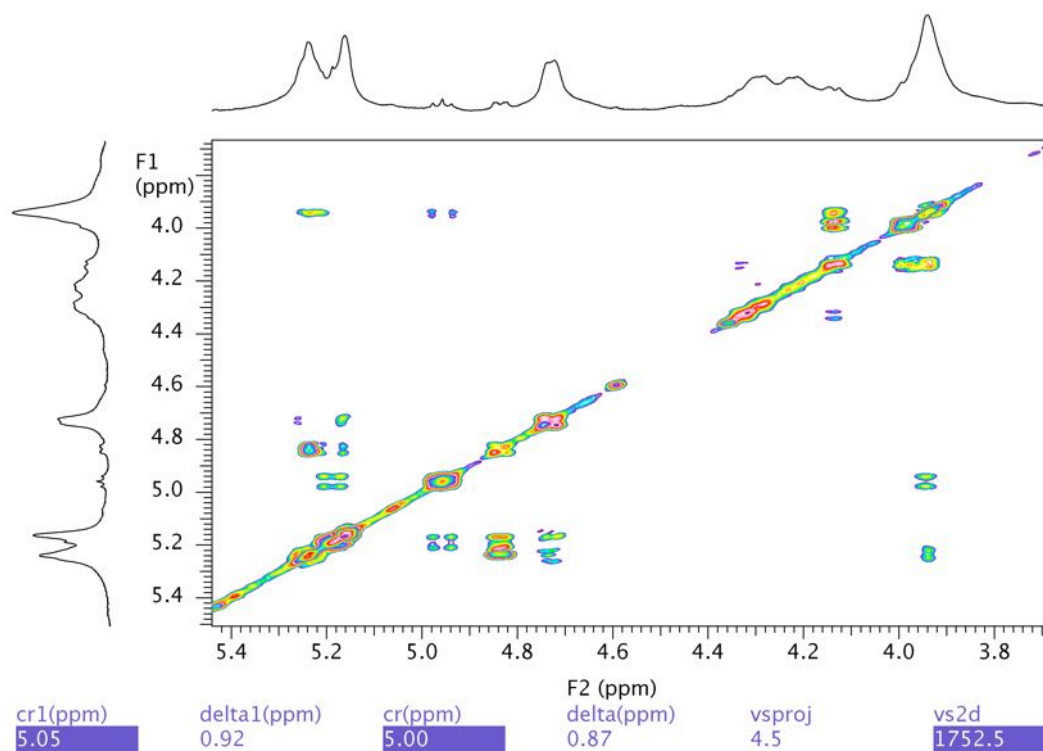
**Fig. 5.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA90 (full spectrum)



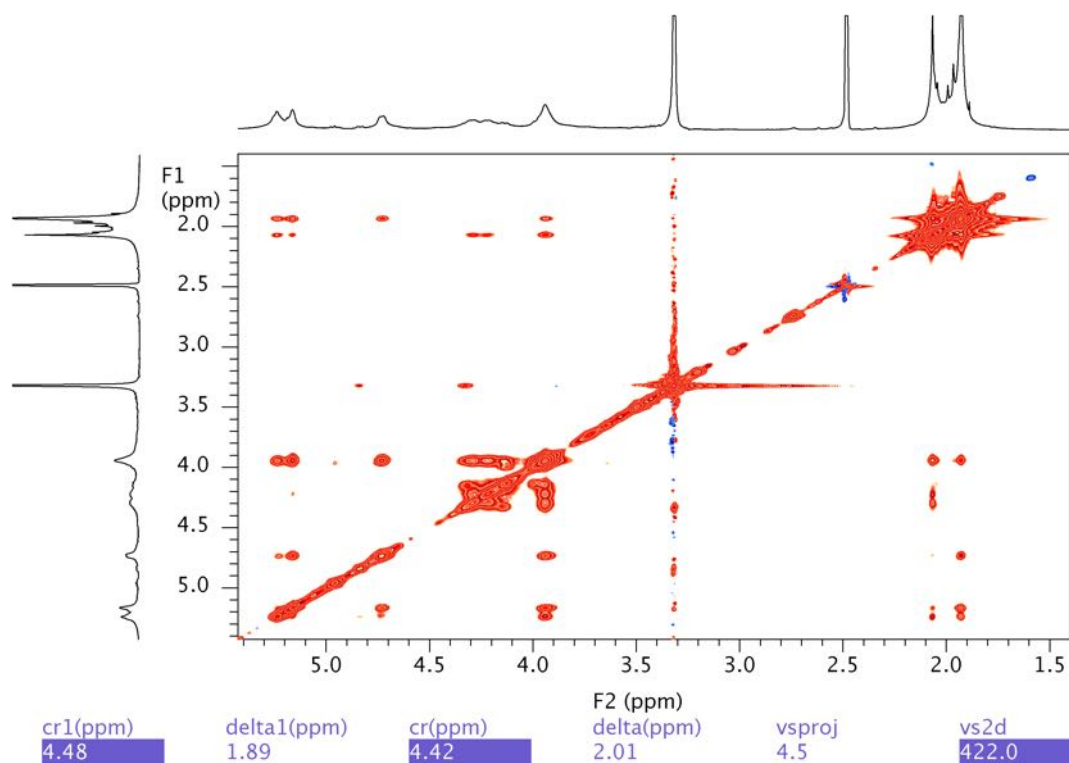
**Fig. 6.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA90 (expansion spectrum)



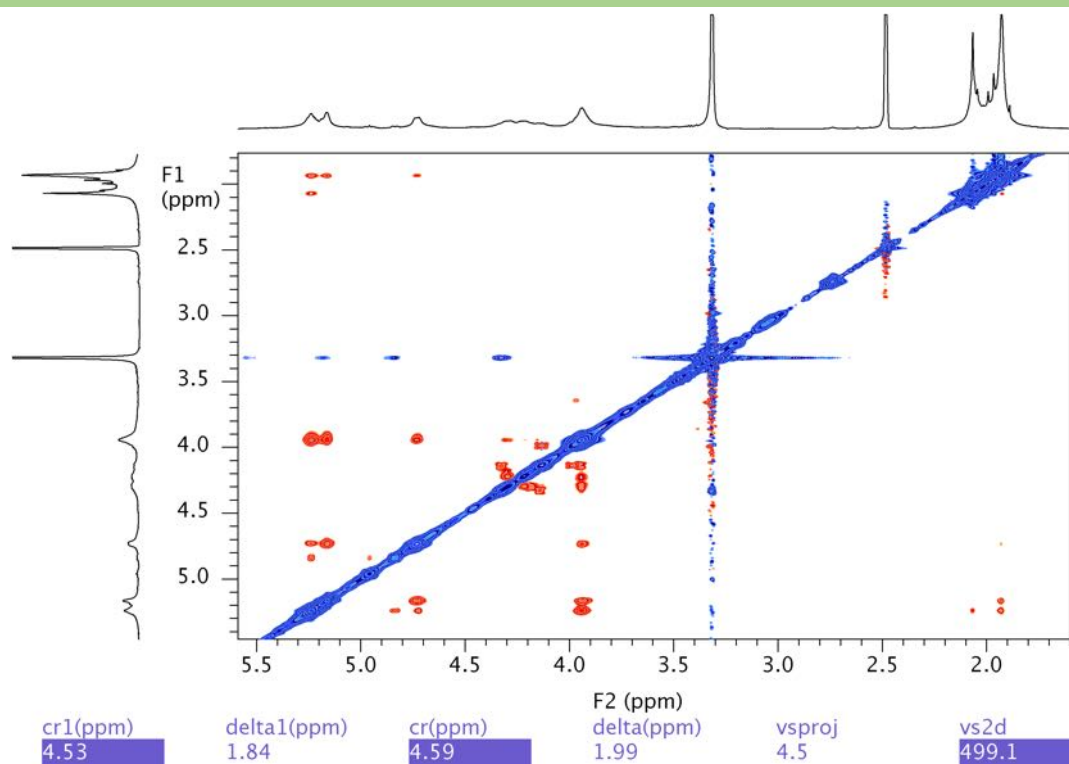
**Fig. 7.** gCOSY at 25 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA120 (full spectrum)



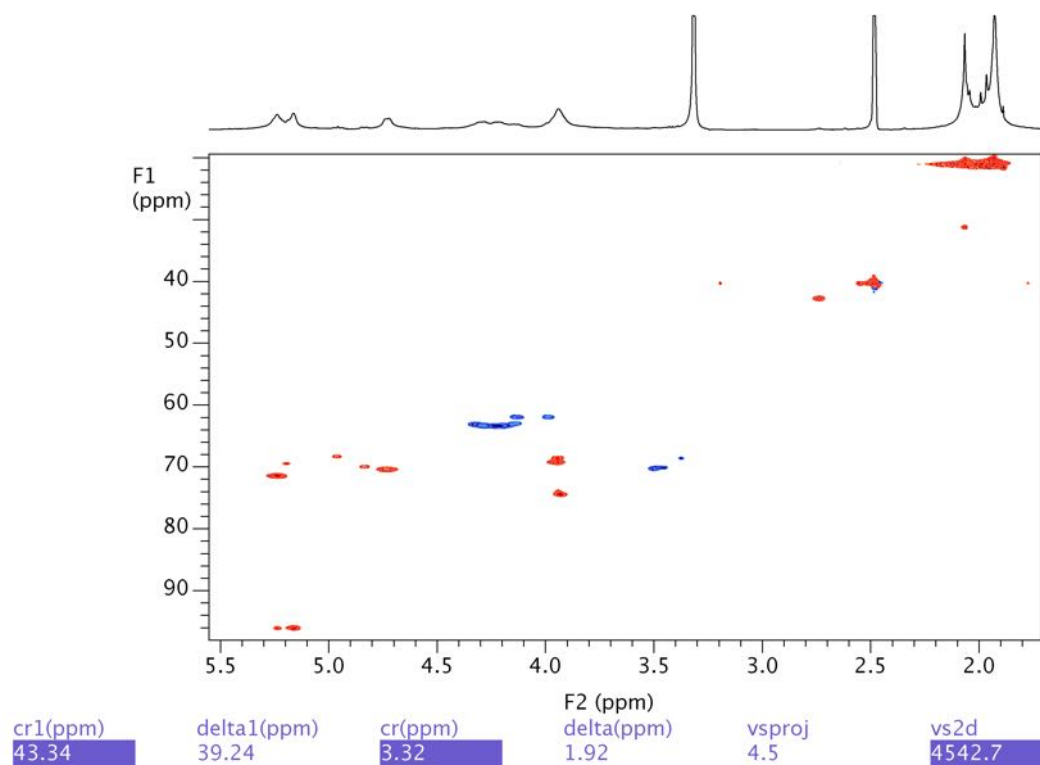
**Fig. 8.** gCOSY at 25 °C in DMSO- $d_6$  of CSA120 (expansion spectrum)



**Fig. 9.** zTOCSY at 25 °C in DMSO- $d_6$  of CSA120 (full spectrum)

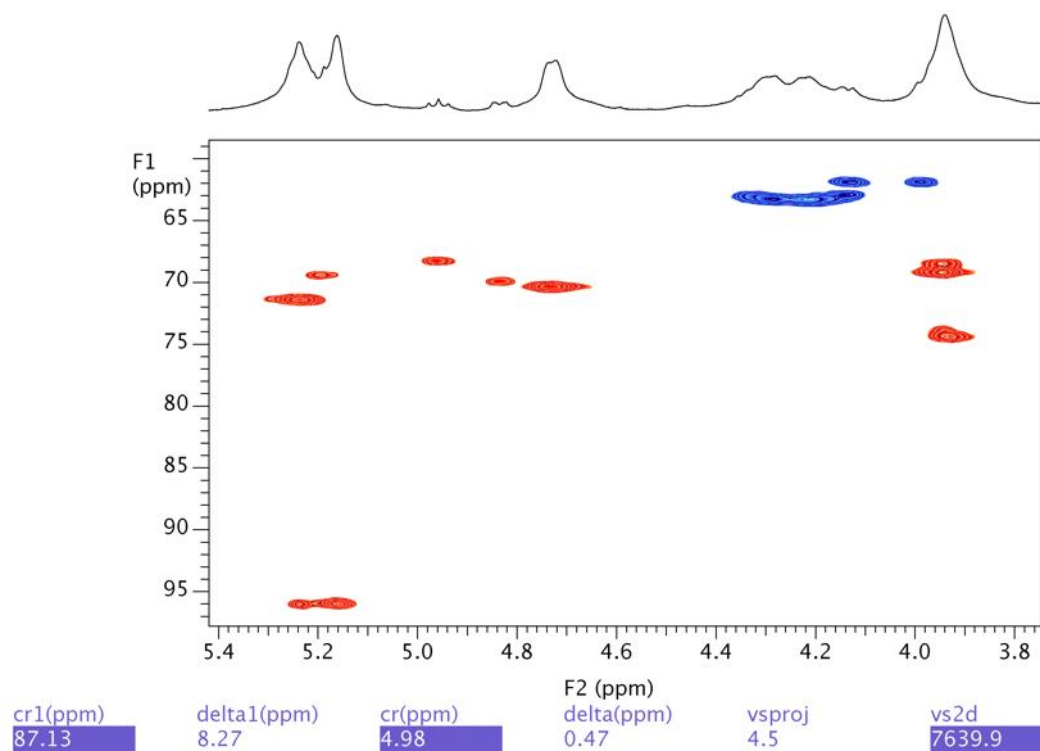


**Fig. 10.** ROESY at 25 °C in DMSO- $d_6$  of CSA120 (full spectrum)

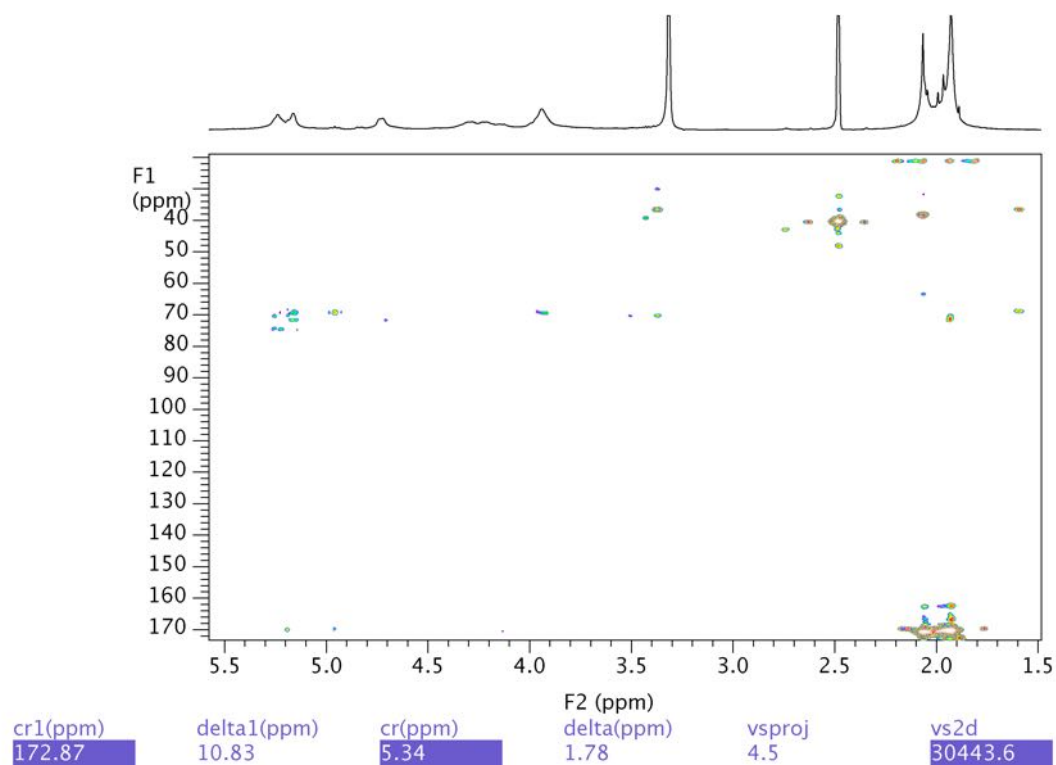


**Fig. 11.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 25 °C in DMSO- $d_6$  of CSA120 (full spectrum)

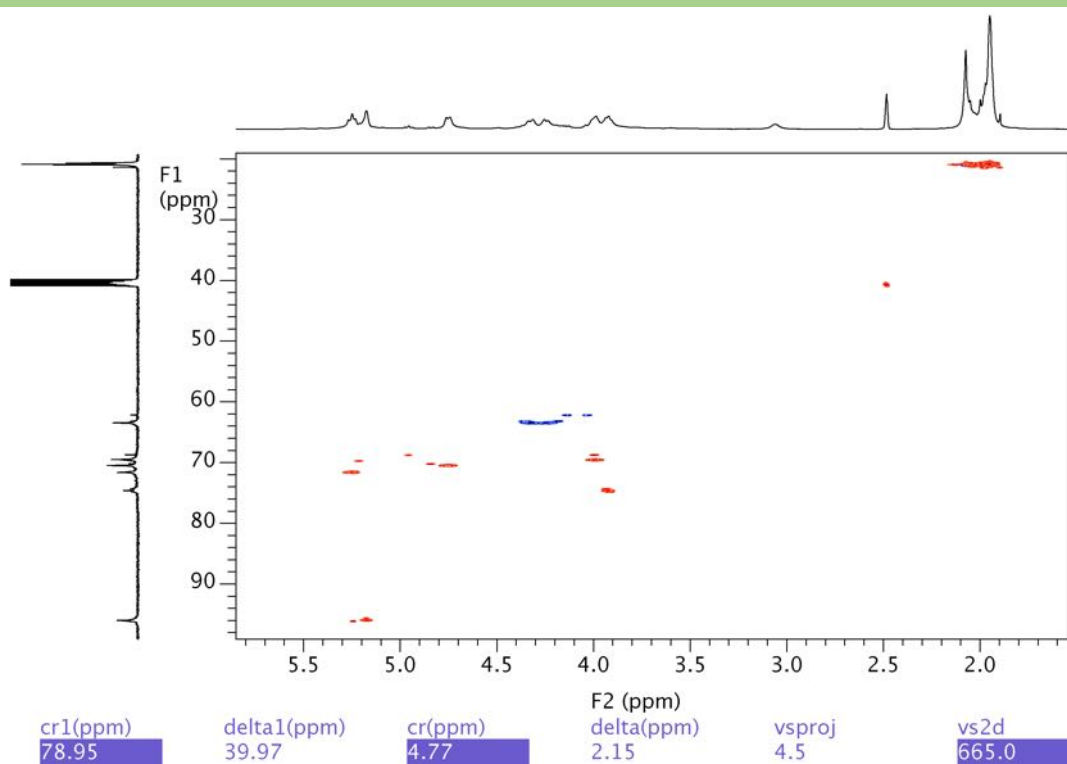




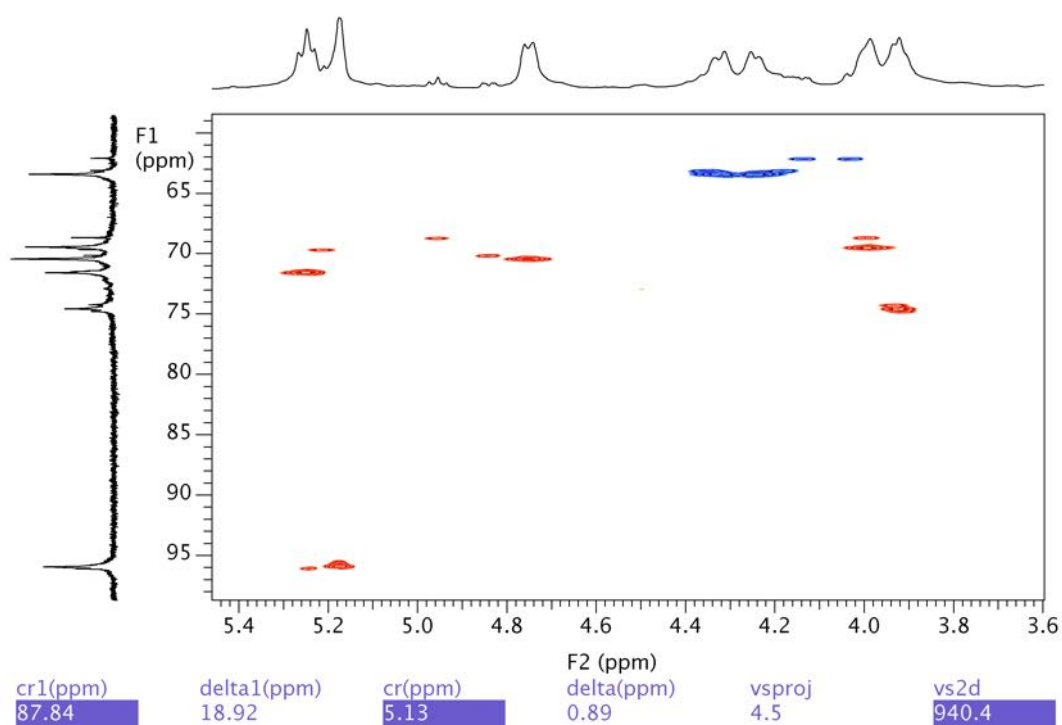
**Fig. 12.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 25 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA120 (expansion spectrum)



**Fig. 13.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC at 25 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA120 (full spectrum)



**Fig. 14.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA120 (full spectrum)



**Fig. 15.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC at 70 °C in  $\text{DMSO-}d_6$  of CSA120 (expansion spectrum)



# Revista de Ciencia y Tecnología Journal of Science and Technology

---

## CERTIFICACION

- - - - - Por la presente se CERTIFICA que el trabajo ***“Películas y materiales compuestos basados en almidón de mandioca acetilado de alto grado de sustitución”*** – Autores: **Cuenca, Pamela S.; Ramallo, Laura A.; Albani, Oscar A.**; ha sido aceptado para su publicación en la *Revista de Ciencia y Tecnología – RECyT (Journal of Science and Technology)* el día 20 de Enero del año 2020. - - - - -

- - - - - Se extiende la presente a los 03 días del mes de Febrero del año 2020, en la Ciudad de Posadas, Provincia de Misiones, Argentina. - - - - -

**Dra. Alicia E. ARES**  
*Editora Principal*  
Revista de Ciencia y Tecnología  
Journal of Science and Technology

# **PELÍCULAS Y MATERIALES COMPUESTOS BASADOS EN ALMIDÓN DE MANDIOCA ACETILADO DE ALTO GRADO DE SUSTITUCIÓN**

Cuenca, Pamela S. <sup>(1)</sup> \*; Ramallo, Laura A. <sup>(1)</sup>; Albani, Oscar A. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio de Preservación y Envases/ Instituto de Materiales de Misiones UNaM- CONICET, Félix de Azara 1552, CP: N3300LQD, Misiones Argentina.

\*Corresponding author. Bchm. Pamela Cuenca. Tel.: +54 0376154239719. E-mail address: pamcuenca@fceqyn.unam.edu.ar; pamcuenca@gmail.com

## **Resumen**

En este trabajo se desarrollaron películas de acetato de almidón de mandioca (AAM) de alto grado de sustitución ( $DS = 2,9$ ) y materiales compuestos consistentes de la resina AAM soportada en papel Kraft. Como un paso previo, la síntesis del acetato de alto grado fue llevada a cabo empleando ácido metilsulfónico como catalizador. Se realizó la caracterización de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas obtenidas. Las películas de almidón de mandioca acetilado resultaron homogéneas y continuas, de apariencia plástica, pero frágiles. El agregado de 50% de plastificante permitió obtener películas con buenas propiedades mecánicas (tensión de rotura 17,5 MPa y deformación de rotura de 8,2 %) pero que, con el almacenamiento, se volvieron cerosas y frágiles. Las películas compuestas de papel Kraft - acetato de almidón de mandioca tienen valores de permeabilidad al vapor de agua menores (hasta el 51%) que los papeles sin tratar, a la vez que sus propiedades mecánicas son mejores (tracción de rotura 33 - 42 MPa y elongación 2 - 4%)

Por lo tanto, el desarrollo de envases biodegradables basados en materiales de almidón acetilado - celulosa parece una buena opción para el reemplazo de envases que no son ambientalmente compatibles.

Palabras claves: Acetato de almidón de mandioca; Alto grado de sustitución; Películas

libres; Materiales compuestos.

## **FILMS AND COMPOSITES BASED ON ACETYLATED CASSAVA STARCH OF HIGH DEGREE OF SUBSTITUTION**

### **Abstract**

In this work, Cassava starch acetate (CSA) with high degree of substitution (DS = 2.9) films and composite materials consisting of CSA resin supported on Kraft paper were developed. As a previous step, the synthesis of high degree acetate was carried out using methysulfonic acid as a catalyst. The characterization of the mechanical and barrier properties of the films obtained was performed. Acetylated cassava starch films were homogeneous and continuous, plastic in appearance, but brittle. Addition of 50% plasticizer allowed to obtain films with good mechanical properties (tensile strength at break 17,5 MPa y deformation 8,2 %) but with storage, became waxy and brittle. The films composed of Kraft paper – cassava starch acetate have lower water vapor permeability values (up to 51%) than untreated papers, and their mechanical properties are better (tensile strength at break 33- 42 MPa and deformation 2 - 4%). Therefore, the development of biodegradable packages based on acetylated starch-cellulose materials seems a good option for the replacement of packages that are not environmentally compatible.

Keywords: Cassava starch acetate; High degree of substitution; Free films; Composites.

### **1. Introducción**

La contaminación del ambiente debida a los desechos de envases plásticos es uno de los problemas a resolver por la sociedad actual. En los últimos años, el interés en encontrar alternativas ecológicas para el material plástico no degradable hecho de petróleo, ha llevado a muchos investigadores a poner énfasis en los materiales poliméricos naturales de origen agrícola. [1–4].

El almidón ha sido una de las mejores alternativas porque es un material renovable de bajo costo. Entre los almidones, el de mandioca destaca por su bajo precio y amplia disponibilidad.

El almidón presenta el inconveniente que, en su estado nativo, es muy sensible a la humedad y sus películas tienen alta permeabilidad al vapor de agua. Esto ha llevado a un importante número de investigadores a trabajar con modificaciones del almidón. De las distintas modificaciones químicas posibles, la acetilación, es una de las formas más simples de mejorar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón [5].

Numerosos investigadores estudiaron el efecto de la acetilación en las propiedades de los acetatos de bajo y medio grado de sustitución [6] [7] [8] [9] [10]. Todas las modificaciones realizadas en los trabajos antes citados conducen a un material con buenas propiedades mecánicas pero soluble en agua.

Acetatos con alto grado de sustitución han sido preparados utilizando distintos procedimientos en medio alcalino [11] [12] y en medio ácido [13] [14]. El método de acetilación propuesto por Feuer [13], utilizando como catalizador ácido metilsulfónico (MSA), provee un éster de almidón caracterizado por mayor peso molecular y menor pérdida de blancura, lo que sería útil en su uso como material de recubrimiento.

La hidrofobicidad del acetato de almidón se incrementa a medida que aumenta el grado de sustitución y la longitud de la cadena del sustituyente. Fringant y col. [15] informaron que acetato de almidón con un DS mayor que 1,7 presenta propiedades típicamente hidrofóbicas. Una serie de estudios encontraron buena compatibilidad de acetato de almidón con otros materiales, dando como resultado un material con propiedades mecánicas mejoradas [12] [16] [4].

Tarvainen y col. [17] mostraron que el acetato de almidón de papa de grado de sustitución 2.8, permite obtener por casting películas claras y continuas con alta hidrofobicidad. Tarvainen y col. [18] investigaron la capacidad de los n-alquenil anhídridos succínicos o (n-ASA) como plastificantes externos, a fin de mejorar las características de formación de

película de acetato de almidón de papa de grado de sustitución 2,8, obteniendo buenos resultados.

Por otro lado, considerando que existen pocos trabajos que describen el comportamiento de películas de acetato de almidón de alto grado y asumiendo que su carácter hidrófobo mejoraría las propiedades de barrera al vapor de agua, podrían utilizarse soluciones filmogénicas de este polímero como resina para generar materiales compuestos sobre una base de algún material de refuerzo como el papel Kraft, que contribuya a mejorar las propiedades mecánicas. Larotonda y col. [19] [20] mostraron que la impregnación de papeles simples con acetato de almidón de mandioca, con grado de sustitución de 1,4 mejora las propiedades de permeabilidad al vapor de agua, así como otras propiedades mecánicas del papel. Sin embargo, un DS = 1,41 (el obtenido en estos trabajos) está en la zona de valores de DS en los que el acetilado de almidón es parcialmente soluble en agua. El objetivo del presente trabajo fue sintetizar acetato de almidón de alto grado de sustitución (DS= 2,9) y a partir de él, desarrollar películas libres hidrófobas y materiales compuestos consistentes en una resina de acetato de almidón de alto grado soportada en papel Kraft, a fin de obtener materiales aptos para envases biodegradables. Se realizó la caracterización de las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de los materiales obtenidos.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Materiales**

Almidón de mandioca comercial fue proporcionado por Aldema® (Misiones, Argentina), el agua ultra pura fue provista a partir de un equipo de intercambio iónico Milli-Q, (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA). El anhídrido acético, ácido acético glacial, metanol y glicerol fueron de calidad analítica (Cicarelli® Reagent SA, Santa Fé, Argentina). Ácido metilsulfónico y cloroformo, fueron proporcionado por Merck® (Kenilworth, Nueva Jersey, USA), (2-dodecen-1-il) anhídrido succínico (DSA) fue proporcionado por Sigma Aldrich® (San Luis, Misuri, USA) y papel Kraft de 85 g/m<sup>2</sup> fue adquirido comercialmente y utilizado en las condiciones de recepción.

## 2.2. Síntesis de acetato de almidón de mandioca (AAM) alto grado de sustitución

Para la síntesis de acetato de almidón de mandioca altamente sustituido, se utilizó el método de Feuer modificado [13] que propone una reacción en medio ácido con ácido metilsulfónico como catalizador.

El almidón, cuyo porcentaje de humedad es aproximadamente del 11%, se secó previamente en estufa a 60 °C durante toda la noche. Se mezclaron 30 g de almidón con 54 mL de anhídrido acético y 55 mL de ácido acético glacial. Luego, el catalizador de esterificación, ácido metilsulfónico (MSA), diluido en ácido acético, se añadió lentamente durante un período de 10 minutos. Posteriormente la mezcla se calentó y se mantuvo entre 80 °C y 95 °C en 120 minutos.

Al final, se añadió agua destilada fría (5-6 °C) a la solución para detener la reacción y precipitar el acetato de almidón. El precipitado blanco obtenido se lavó 2 veces con agua destilada y una con metanol, se secó en un horno a 40 °C durante 24 horas y se almacenó en un desecador a temperatura ambiente.

## 2.3. Determinación del grado de sustitución mediante valoración química por retorno

El grado de sustitución del acetato de almidón se determinó mediante titulación de retorno utilizando el método de Miladinov & Hanna [21]. Se colocó una cantidad de 0,5 g de almidón acetilado en un recipiente de 250 mL con agua destilada (50 mL) y se ajustó el pH a 7 con HCl 0,02 N. Luego se agregaron 25 mL de NaOH 0,5 N y se calentaron en una placa caliente con agitación vigorosa hasta obtener una solución transparente. El exceso de NaOH se valoró de nuevo a pH 7 con HCl. El grado de sustitución (DS) se calculó según lo propuesto por Xu y col. [12]:

$$\text{Grado de Sustitución (DS)} = \frac{162 \cdot (N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} - N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}})}{1000 \cdot W - 42 \cdot (N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} - N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}})} \quad (1)$$

donde  $N_{\text{NaOH}}$  es la normalidad de NaOH,  $V_{\text{NaOH}}$  es el volumen de NaOH,  $N_{\text{HCl}}$  es la normalidad de HCl usado para valorar de nuevo,  $V_{\text{HCl}}$  es el volumen de HCl usado para titular.



#### 2.4. Preparación de películas de AAM

Las películas fueron preparadas utilizando una concentración de acetato de almidón de mandioca (DS = 2,9) del 5% (p/v) en cloroformo, empleando DSA como plastificante externo en las siguientes concentraciones: 0, 20 y 50% (el porcentaje de plastificante está referido a la masa de AAM en la solución). Una vez homogeneizados los componentes, se introdujo un tiempo de espera de 4 hs a las soluciones filmogénicas para favorecer la plastificación del polímero antes del moldeo. Las películas libres se formaron por “casting” volcando 60 mL de la solución filmogénica en moldes de 10 cm de diámetro a 25 °C y dejando evaporar el solvente por 24 hs. Una vez desmoldadas, las películas se almacenan en ambiente de humedad controlada 53%.

#### 2.5. Preparación de materiales compuestos

Para la preparación de la resina se solubilizó acetato de almidón de mandioca en cloroformo en concentraciones del 5, 10 y 20% (p/v). Se ensayaron dos plastificantes externos de naturaleza química distinta DSA y glicerol en concentraciones del 5, 10 y 30% referido a la masa de AAM en la solución. El refuerzo utilizado para el material compuesto fue papel Kraft, de 85 g cortado en discos de 12 cm de diámetro y pre secados en estufa a 40°C durante toda la noche. Los refuerzos fueron inmersos en la resina en diferentes tiempos (10, 30 y 50 min). Los ensayos se realizaron según el diseño experimental presentado en la Tabla 1. Después de la impregnación las muestras fueron colocadas en desecador por 24 horas.

**Tabla 1:** Concentraciones y tiempo de inmersión utilizados en los ensayos iniciales de impregnación.

<i><b>Tiempo de inmersión (min)</b></i>	<i><b>Concentración de sol. AAM (%)</b></i>
<b>10</b>	<b>5</b>

<b>10</b>	<b>20</b>
<b>50</b>	<b>5</b>
<b>50</b>	<b>20</b>
<b>30</b>	<b>10</b>
<b>30</b>	<b>10</b>
<b>50</b>	<b>10</b>

---

## 2.6. *Observación y micrografías*

Las observaciones microscópicas se realizaron, con un microscopio óptico marca Zeiss en un aumento de 100X, y se fotografiaron con cámara complementaria.

## 2.7. *Propiedades mecánicas*

Los ensayos de tracción se realizaron con una máquina de tensión / compresión marca Adamel Lhomagry (Francia) modelo DY 32 / 34 con rango de 10 N a 5 KN, con celdas intercambiables con una exactitud de 0,5% (0,1% a fondo de escala), rango de velocidades de 0,01 a 999 mm/min y con registro automático de tensión - deformación.

Se utilizaron probetas de 25 mm x 50 mm para películas libres y de 15 mm x 70 mm para materiales compuestos, registrándose tracción - deformación y energía absorbida a una velocidad constante de 0,4 mm/min.

## 2.8. *Permeabilidad al vapor de agua*

La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) de las películas libres y de los “composites” fueron evaluadas con el método cuasi-isostático, utilizado en envases de yerba [22] y siguiendo el procedimiento general descrito en las Normas TAPPI, T464 om-95 [23] y norma ASTM E96 [24].

Las experiencias se llevaron a cabo por triplicado. La humedad relativa externa (55%) se fijó empleando solución salina saturada y se utilizó silica gel como desecante. La temperatura de las cabinas de ensayo se mantuvo constante en estufa con una precisión de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se

registró la variación de peso de la celda en balanza electrónica marca Ohaus, con precisión de 0,001 g.

### **3. Resultados y discusión:**

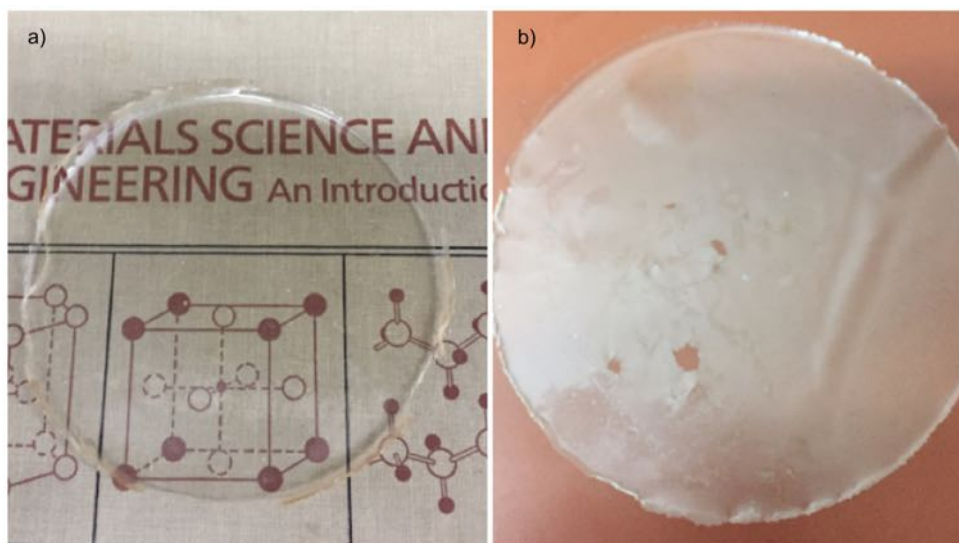
#### *3.1. Acetato de almidón de mandioca*

Empleando el método de Feuer, se obtuvieron acetatos de almidón de mandioca (AAM) altamente hidrófobos, con un rendimiento de reacción del 85 %. El valor promedio de DS medidos por titulación para tiempo de reacción de 120 minutos fue de  $2,9 \pm 0,1$  para tres repeticiones. La utilización de MSA como catalizador de reacción generó productos de mayor blancura y mayor peso molecular que otros métodos de acetilación, en coincidencia a los resultados de Feuer [13].

#### *3.2. Apariencia de películas de AAM*

Las películas obtenidas a partir de soluciones de acetato de almidón de mandioca (DS 2,9) resultaron homogéneas y continuas con respecto a su contenido y espesor, de apariencia plástica, pero muy frágiles. El agregado de plastificante a las soluciones filmogénicas mejoró la apariencia y las propiedades mecánicas (tensión y deformación de rotura) de los films obtenidos. Por otra parte, el hecho de que las películas sean completamente transparentes confirma la idea de que tanto el solvente como el plastificante fueron perfectamente compatibles en la matriz polimérica. Las películas de acetato de alto grado y 50% de DSA, mostraron excelentes propiedades al desmoldarlas (Figura 1a), pero luego de dos semanas de almacenamiento, se volvieron cerosas producto de la segregación del plastificante hacia la superficie de las mismas (Figura 1 b), tornando a la película excesivamente quebradiza. Al ser el plastificante una molécula de alto peso molecular, de naturaleza mayormente apolar debido a su larga cadena hidrocarbonada, la asociación a las moléculas del polímero sería mayoritariamente debido a fuerzas de Van der Waals y al encontrarse en altas concentraciones en la matriz polimérica, la afinidad química hace que las moléculas migren hacia regiones de menor energía libre, esto es hacia la superficie. Por otro lado, la hidrólisis

del anhídrido succínico (extremo polar) afectaría el estado de agregación del plastificante favoreciendo la segregación del mismo.



**Figura 1.** Películas de acetato de almidón de mandioca DS 2.9 al 5% con 50 % de DSA. a) recién desmoldada b) luego de dos semanas de almacenamiento.

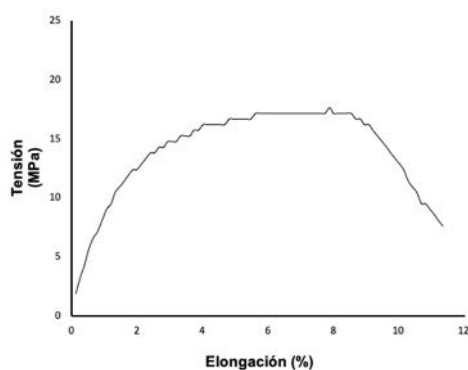
### 3.3. *Permeabilidad al vapor de agua de películas de AAM*

En la Tabla 2 se presentan las propiedades de barrera al vapor de agua de la única formulación que resultó apta para el ensayo. Se encuentra una mejora significativa en las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas de AAM obtenidas en este trabajo con respecto a las películas de almidón nativo de mandioca reportados por Mali y col. [25], Müller y col. [26] y de almidón nativo maíz informados por Slavutsky y Bertuzzi [27]. La baja permeabilidad medida podría atribuirse a la hidrofobicidad de la molécula de acetato de almidón, ya que los tres grupos hidroxilos han sido sustituidos en las tres posiciones posibles de la anhidroglucosa y los grupos acetato sustituyentes dotan de carácter apolar a las moléculas del polímero [5]. Por otro lado, al utilizarse un plastificante de la misma naturaleza química, se mantiene el efecto de la hidrofobicidad del film al tiempo que se evitan fenómenos de incompatibilidad que normalmente derivan en agrietamientos.

Tarvainen y col. [18] reportan para almidones de papa con DS 2,8 con 50% de anhídrido octenil succínico (OSA) como plastificante, valores de permeabilidad de  $1,63 \cdot 10^{-10}$  g/msPa, semejantes que los obtenidos en el presente trabajo.

### 3.4. *Propiedades mecánicas de películas de AAM*

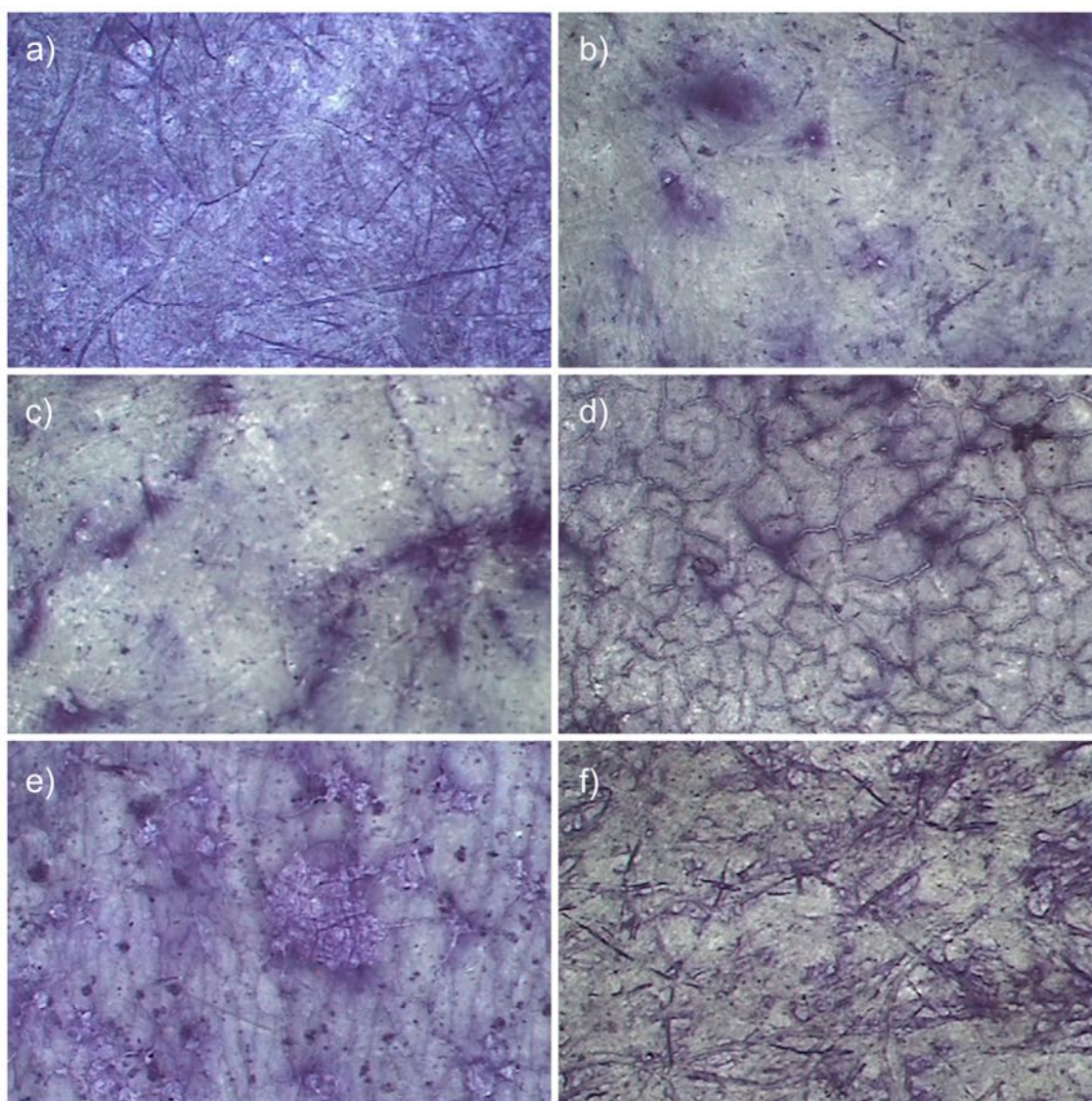
Las películas no plastificadas y con contenidos de DSA del 20% desarrolladas en este estudio fueron demasiado rígidas y frágiles, por lo que se requirió un contenido de plastificante del 50% para lograr películas aptas para las pruebas de tracción. La alta concentración de plastificante requerida para relajar las cadenas del polímero, podría deberse a la estructura molecular compleja del AAM y a su alto peso molecular. Tarvainen y col. [17] detallan que la estructura compleja del acetato de almidón crea lugares de enlaces para cadenas de polímero adyacentes, lo que permite que se formen fuertes fuerzas cohesivas y estructuras tenaces y densas en los films. En la Figura 2 se presenta la curva característica tensión - deformación de películas de AAM con 50 % de DSA. Las propiedades mecánicas de estas películas, demuestran que el material es dúctil con valores de tensión de rotura promedio  $17,50 \pm 0,60$  MPa y deformación de rotura de  $8,24 \pm 0,70$  %. Los valores máximos de tensión obtenidos en este estudio fueron significativamente mejores que los reportados por Tarvainen y col. [18] (9,1 Mpa) para películas de acetato de almidón de papa con el mismo DS utilizando el mismo plastificante.



**Figura 2.** Diagrama Tensión - Elongación de películas de acetato de almidón de mandioca con grado de sustitución de 2,9 y 50% de DSA como plastificante.

### 3.5. *Materiales compuestos: apariencia y micrografías de las películas compuestas*

La apariencia de los papeles impregnados con la resina de AAM, se asemejó a un papel encerado o al de una película “plástica”, traslúcida, esto fue especialmente notable en los ensayos de mayores tiempos de inmersión y concentraciones. Las micrografías que muestran el efecto del tiempo de inmersión en soluciones de AAM a distintas concentraciones, así como el efecto del agregado de plastificantes de distinta naturaleza química se presentan en la Figura 3.



**Figura 3.** Micrografías de: a) Papel Kraft sin tratar. b) 10% de AAM - 10 min de inmersión. c) 10% AAM - 50 min de inmersión. d) 20% de AAM - 10 min de inmersión. e) 10% de AAM - 30% glicerol - 30 min de inmersión. f) 10% de AAM - 5% de DSA - 10 min de inmersión.

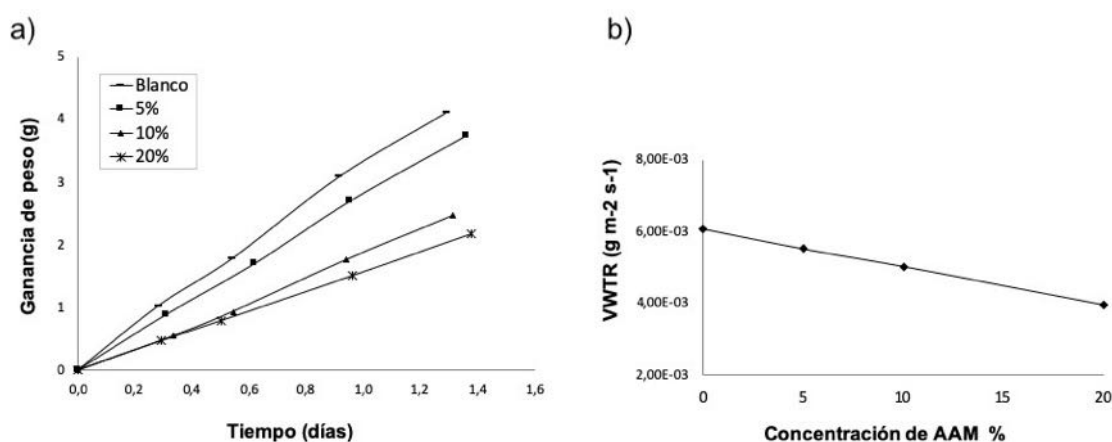
En la micrografía del papel sin tratar (blanco), se aprecian las fibras del papel que con la impregnación en acetato de almidón dejaron de ser visibles, esto se debió a la incorporación de acetato de almidón en los espacios entre fibras. Este efecto se incrementó conforme aumentó el tiempo de inmersión para materiales con resinas del 10% de AAM, sugiriendo que el “coating” se produce por la incorporación de la resina al interior del “film” en lugar de ser un fenómeno netamente superficial.

Para concentraciones del 20% de AAM, aún en tiempos cortos de inmersión (10 min), se observó un “cuarteado”, en la superficie del material. Esta falta de homogeneidad se podría deber a que a esta concentración la cantidad de resina que permanece sobre la superficie forma una capa de mayor espesor, la cual en el proceso de secado sufre agrietamiento.

Los plastificantes ensayados no formaron una fase continua en el material, sino que se visualizó segregación en la superficie, tanto para el caso del glicerol como para el DSA (Figura 3e y 3f).

### 3.6. Permeabilidad al vapor de agua de materiales compuestos

En la Figura 4 se presentan los resultados de ganancia de peso y VWTR en celdas cubiertas con papeles Kraft sin tratar e impregnados en soluciones de acetato de almidón de mandioca de concentraciones de 5, 10 y 20 %, utilizando tiempos de impregnación de 10 minutos, expuestas a condiciones ambientales 55% HR y 38°C.



**Figura 4.** Valores de (a) Ganancia de peso y (b) VWTR de papeles impregnados en AAM 5, 10 y 20%, medidos a 38 °C, 0 y 55% HR.

Desde el comienzo las celdas cerradas con papeles impregnados ganaron menos agua, lo que implicó menor permeabilidad al vapor de agua y esta mejora fue proporcional a la concentración de acetato en el rango de concentraciones estudiado.

Los valores de velocidad de transmisión al vapor de agua (VWTR) y permeabilidad (P) calculados en papeles impregnados durante 10 minutos, expuestos a condiciones ambientales 55% HR y 38 °C, para las distintas concentraciones de AAM ensayadas, se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Valores de VWTR y permeabilidad calculados para películas y papeles impregnados en distintas concentraciones de AAM y expuestos a 55% HR a 38 °C.

<i>Material</i>	<i>VWTR</i> <i>(g/m<sup>2</sup>s)</i>	<i>Desviación</i> <i>Estándar VWTR</i>	<i>Permeabilidad</i> <i>(g/msPa)</i>
AAM 5% 50% DSA*	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$2,91 \cdot 10^{-5}$	$1,29 \cdot 10^{-10}$
Papel Kraft+ 0% AAM	$6,90 \cdot 10^{-3}$	$4,71 \cdot 10^{-4}$	$2,52 \cdot 10^{-10}$
Papel Kraft+ 5 % AAM	$5,53 \cdot 10^{-3}$	$3,88 \cdot 10^{-4}$	$2,02 \cdot 10^{-10}$
Papel Kraft+ 10 % AAM	$5,04 \cdot 10^{-3}$	$2,12 \cdot 10^{-4}$	$1,84 \cdot 10^{-10}$
Papel Kraft+20 % AAM	$3,97 \cdot 10^{-3}$	$4,95 \cdot 10^{-5}$	$1,45 \cdot 10^{-10}$

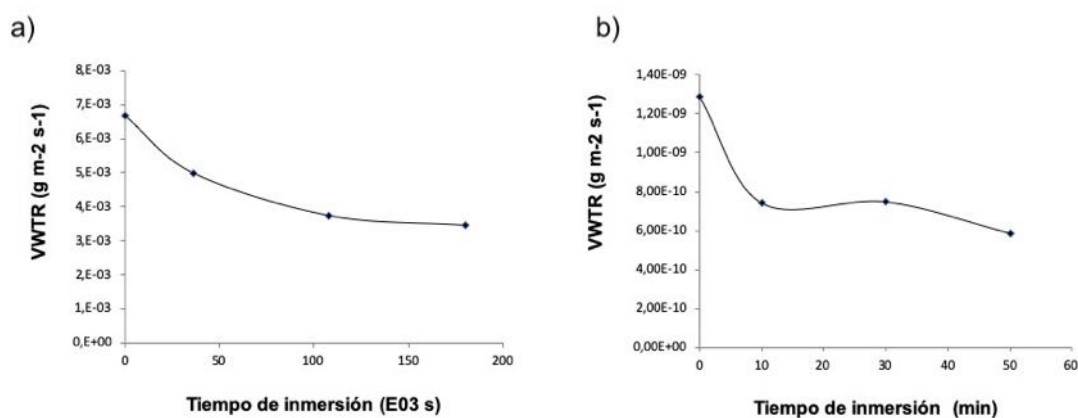
\*El espesor promedio de las películas es de  $1,5 \cdot 10^{-4}$ m.

Puede observarse que se encuentra una mejora del 58% en las propiedades barrera del papel cuando se aumenta la concentración de las soluciones de impregnación al 20% de AAM, para un tiempo de inmersión de 10 minutos. Larotonda y col. [19], obtuvieron reducciones de permeabilidad del mismo orden para resinas compuestas de un 20 % de AAM con un DS de 1,41. Teniendo en cuenta que en este trabajo el grado de sustitución del almidón acetilado fue de 2,9, no pareciera haber un efecto del grado de sustitución del AAM en este rango.

Por otra parte, cuando se estudió el efecto del tiempo de inmersión para soluciones de AAM en cloroformo en concentraciones de 10 y 20%, la permeabilidad al vapor de agua



disminuyó con el aumento del tiempo de inmersión de manera significativa. Los resultados pueden verse en la Figura 5.



**Figura 5.** Efecto del tiempo de inmersión en soluciones de (a) AAM al 10% y (b) AAM al 20%.

Con soluciones al 10% se observó una disminución regular del valor de permeabilidad al vapor de agua, expresado como VWTR, para todos los tiempos de tratamiento en la solución de AAM. La permeabilidad alcanzó a un 74% del valor de permeabilidad del papel sin tratar para un tiempo de inmersión de 10 min y llegó solo al 51% para 50 minutos de inmersión.

Cuando los ensayos para estudiar el efecto del tiempo de impregnación se realizaron con soluciones de AAM en cloroformo al 20%, los valores de VWTR medidos presentaron una significativa disminución del 40% en los primeros tiempos de tratamiento (10 min). Fringant y col. [28], estudiaron el efecto de sucesivas aplicaciones de acetato de almidón de trigo de DS 2,8 en diclorometano sobre papel, encontrando una mejora significativa en la resistencia al agua líquida (similar al polietileno) y proporcional al espesor del film, sin embargo, no encontraron una mejora significativa respecto a la permeabilidad al vapor de agua. La poca eficiencia del triacetato de almidón para reducir la permeabilidad, encontrada por Fringant y col. [28], a diferencia de este estudio, se debería fundamentalmente al modo de aplicación del “coating”, ya que en el presente trabajo la incorporación de la resina se da en toda la

matriz del papel, como se infiere a partir del efecto del tiempo de inmersión que indica un efecto de la difusión de la resina en la matriz del papel.

En cuanto al agregado de plastificantes a las resinas, no se encontró un efecto significativo de mejora en las propiedades de barrera al vapor de agua, este evento es esperable ya que en las micrografías no se observó la formación fases continuas sobre la superficie del film, en las que el plastificante se agrupó formando micelas.

### 3.7. *Propiedades mecánicas de materiales compuestos*

Los papeles impregnados en solución de AAM al 10 y al 20%, utilizando tiempos de inmersión de 10, 30 y 50 minutos fueron sometidos a ensayos de tracción. Los resultados promedio de 4 repeticiones son mostrados en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Valores de tracción, elongación y energía de rotura para papeles con distintos tiempos de impregnación, con resinas al 10 y 20% de AAM.

<i>Muestra</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Tracción</i>	<i>Elongación</i>	<i>Energía</i>
	<i>min</i>	$\sigma$ (MPa)	(%)	(mJ)
10% de AAM <sup>a</sup>	0	19,55 ± 1,81 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,13 <sup>a</sup>	37,16 ± 4,07
	10	35,47 ± 3,06 <sup>b</sup>	2,50 ± 0,21 <sup>ab</sup>	84,00 ± 14,14
	30	33,92 ± 1,80 <sup>b</sup>	2,12 ± 0,16 <sup>ab</sup>	64,23 ± 2,03
	50	33,12 ± 2,90 <sup>b</sup>	3,34 ± 0,32 <sup>b</sup>	105,55 ± 0,32
20% de AAM <sup>b</sup>	0	19,55 ± 1,82 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,13 <sup>a</sup>	37,16 ± 4,07
	10	33,94 ± 2,01 <sup>b</sup>	4,12 ± 0,38 <sup>ab</sup>	139,14 ± 16,92
	30	35,85 ± 1,66 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,60 <sup>ab</sup>	128,01 ± 27,06
	50	42,00 ± 1,89 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,23 <sup>b</sup>	84,20 ± 5,79

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas para un nivel de confianza del 95%.

Los valores de tracción de rotura demuestran una mejora significativa en los papeles impregnados con respecto a los papeles sin tratar. La tendencia se apreció claramente en los ensayos realizados para resinas del 20% de AAM. Los resultados obtenidos para el 10% de AAM presentaron cierta dispersión con respecto al tiempo de inmersión, pero en todos los casos se obtuvo una mejora en las propiedades mecánicas. Los valores de energía

consumida hasta la rotura también mostraron un aumento con el tratamiento de impregnación y estuvieron en un rango del 72 al 87% mayor que el valor de la muestra sin tratar.

#### **4. Conclusiones**

Fue posible sintetizar acetato de almidón de mandioca de alto grado de sustitución (DS 2,9), insoluble en agua y con buen rendimiento de reacción. A partir del ester de almidón, se desarrollaron películas libres y materiales compuestos consistentes en una resina del polímero sintetizado, soportado en papel Kraft.

Las películas de almidón de mandioca acetilado resultaron homogéneas y continuas, de apariencia plástica, pero muy frágiles. El agregado 50% de DSA permitió obtener películas con buenas propiedades mecánicas (tensión de rotura 17,5 MPa, deformación 8,2%) pero que con el almacenamiento, se volvieron cerosas y frágiles.

Los materiales compuestos de papel Kraft - acetato de almidón de mandioca DS =2,9 tienen valores de permeabilidad al vapor de agua menores (hasta el 51%) que las de los papeles sin resina, a la vez que sus propiedades mecánicas son mejores (tracción y energía de rotura 72-87% mayores). Hay un efecto positivo de la concentración de acetato de la solución impregnante y del tiempo de inmersión sobre los valores de VWTR. El efecto del tiempo de inmersión y las micrográficas sugieren que la incorporación de acetato ocurre “en masa” es decir incorporándose en los espacios interfibra de la estructura del papel Kraft, y no formando únicamente una película superficial.

Este estudio demuestra que la utilización de acetato de almidón de alto grado de sustitución en el desarrollo de materiales compuestos sería una alternativa interesante en la generación de envases biodegradables.

#### **5. Referencias**

- [1] A.M. Youssef, F.M. Assem, S.M. El-Sayed, H. Salama, M.H. Abd El-Salam, Utilization of Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Preservation of Cheeses, J. Packag. Technol. Res. 1 (2017) 87–99. doi:10.1007/s41783-017-0012-3.

- [2] P.G. Seligra, C. Medina Jaramillo, L. Famá, S. Goyanes, Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent, *Carbohydr. Polym.* 138 (2016) 66–74. doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.041.
- [3] T. Garrido, M. Peñalba, K. de la Caba, P. Guerrero, A more efficient process to develop protein films derived from agro-industrial by-products, *Food Hydrocoll.* 86 (2019) 11–17. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.11.023.
- [4] X. Jiang, H. Li, Y. Luo, Y. Zhao, L. Hou, Studies of the plasticizing effect of different hydrophilic inorganic salts on starch/poly (vinyl alcohol) films, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 223–230. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.046.
- [5] P. Cuenca, S. Ferrero, O. Albani, Preparation and characterization of cassava starch acetate with high substitution degree, *Food Hydrocoll.* 100 (2020) 105430. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105430.
- [6] J. Singh, L. Kaur, N. Singh, Effect of acetylation on some properties of corn and potato starches, *Starch/Staerke.* (2004). doi:10.1002/star.200400293.
- [7] N.S. Sodhi, N. Singh, Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars, *J. Food Eng.* (2005). doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.09.018.
- [8] O. V. López, N.E. Zaritzky, M.A. García, Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity, *J. Food Eng.* 100 (2010) 160–168. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041.
- [9] R. Colussi, V.Z. Pinto, S.L.M. El Halal, N.L. Vanier, F.A. Villanova, R. Marques E Silva, E. Da Rosa Zavareze, A.R.G. Dias, Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches, *Carbohydr. Polym.* (2014). doi:10.1016/j.carbpol.2013.12.070.
- [10] O.F. Osundahunsi, K.T. Seidu, R. Mueller, Effect of presence of sulphurdioxide on acetylation and sorption isotherm of acetylated starches from cultivars of cassava, *Food Chem.* 151 (2014) 168–174. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.020.
- [11] R.L. Shogren, Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction, *Carbohydr. Polym.* (2003). doi:10.1016/S0144-8617(02)00305-3.
- [12] Y. Xu, V. Miladinov, M.A. Hanna, This article is from the November-December 2004 issue of published by the American Association of Cereal Chemists , Inc . Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution 1, *Cereal Chem.* 81 (2004) 735–740.

- [13] B.I. Feuer, Method of making starch acetate using an acid catalyst, 5710269, 1998.
- [14] C.I.K. Diop, H.L. Li, B.J. Xie, J. Shi, Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates, *Food Chem.* 126 (2011) 1662–1669. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.050.
- [15] C. Fringant, M. Rinaudo, M.F. Foray, M. Bardet, Preparation of mixed esters of starch or use of an external plasticizer: Two different ways to change the properties of starch acetate films, *Carbohydr. Polym.* 35 (1998) 97–106. doi:10.1016/S0144-8617(97)00250-6.
- [16] J. Guan, M.A. Hanna, Extruding foams from corn starch acetate and native corn starch, *Biomacromolecules*. (2004). doi:10.1021/bm049512m.
- [17] M. Tarvainen, R. Sutinen, S. Peltonen, P. Tiihonen, P. Paronen, Starch acetate - A novel film-forming polymer for pharmaceutical coatings, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 282–289. doi:10.1002/jps.10027.
- [18] M. Tarvainen, R. Sutinen, S. Peltonen, H. Mikkonen, J. Maunus, K. Vähä-Heikkilä, V.P. Lehto, P. Paronen, Enhanced film-forming properties for ethyl cellulose and starch acetate using n-alkenyl succinic anhydrides as novel plasticizers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 19 (2003) 363–371. doi:10.1016/S0928-0987(03)00137-4.
- [19] F.D.S. Larotonda, K.S. Matsui, S.S. Paes, J.B. Laurindo, Impregnation of Kraft paper with cassava-starch acetate - Analysis of the tensile strength, water absorption and water vapor permeability, *Starch/Stärke*. 55 (2003) 504–510. doi:10.1002/star.200300179.
- [20] F.D.S. Larotonda, K.N. Matsui, P.J.A. Sobral, J.B. Laurindo, Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate, *J. Food Eng.* 71 (2005) 394–402. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.11.002.
- [21] V.D. Miladinov, M.A. Hanna, Starch esterification by reactive extrusion, *Ind. Crops Prod.* (2000). doi:10.1016/S0926-6690(99)00033-3.
- [22] L.A. Ramallo, O.A. Albani, Prediction and Determination of Water Uptake in Packaged Yerba Mate, *Food Sci. Technol. Int.* 10 (2004) 35–40. doi:10.1177/1082013204041877.
- [23] J. Trotter, Standard conditioning and testing atmospheres for paper , board , pulp handsheets , and related products ( Revision of T 402 sp-08 ), 2013.
- [24] C. Methods, Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Shipping Containers —, 2003. doi:10.1520/D4279-95R09.2.
- [25] M.C. Galdeano, S. Mali, M.V.E. Grossmann, F. Yamashita, M.A. García, Effects of

- plasticizers on the properties of oat starch films, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 532–538. doi:10.1016/j.msec.2008.09.034.
- [26] L.J.Y. Muller M, Muller cellulose reinforced starch .pdf, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1328–1333.
- [27] A.M. Slavutsky, M.A. Bertuzzi, Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse, *Carbohydr. Polym.* 110 (2014) 53–61. doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.049.
- [28] C. Fringant, M. Rinaudo, N. Gontard, S. Guilbert, H. Derradji, A Biodegradable Starch Based Coating to Waterproof Hydrophilic Materials, *Starch - Stärke.* 50 (1998) 292–296. doi:10.1002/(sici)1521-379x(199807)50:7<292::aid-star292>3.3.co;2-r.